



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS HUMANAS E NATURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA VEGETAL

RAQUEL PEREIRA PASSOS SALGADO

**ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE MAMOEIROS**  
(*Carica papaya* L.) **INFECTADOS COM *Papaya ringspot virus* E *Papaya***  
***meleira virus*.**

VITÓRIA  
2015

RAQUEL PEREIRA PASSOS SALGADO

**ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE MAMOEIROS**  
**(*Carica papaya* L.) INFECTADOS COM *Papaya ringspot virus* E *Papaya***  
***meleira virus*.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da Universidade Federal do Espírito Santo, para obtenção do título de Mestre em Biologia Vegetal.

Área de Concentração: Fisiologia Vegetal.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patricia Machado Bueno Fernandes.

VITÓRIA  
2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

S164a Salgado, Raquel Pereira Passos, 1985-  
Análise do desenvolvimento de sementes de mamoeiros  
(*Carica papaya* L.) infectados com *Papaya ringspot virus* e  
*Papaya meleira vírus* / Raquel Pereira Passos Salgado. – 2015.  
88 f. : il.

Orientador: Patricia Machado Bueno Fernandes.  
Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade  
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e  
Naturais.

1. Germinação. 2. Mamão - Doenças e pragas. 3.  
Microscopia de força atômica. 4. Viroses de plantas. 5. *Papaya*  
*ringspot virus*-P. 6. *Papaya meleira virus*. I. Fernandes, Patricia  
Machado Bueno. II. Universidade Federal do Espírito Santo.  
Centro de Ciências Humanas e Naturais. III. Título.

CDU: 57

---

**RAQUEL PEREIRA PASSOS SALGADO**

**“ANÁLISE DO DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE  
MAMOEIROS (*Carica papaya* L.) INFECTADOS COM *Papaya  
ringspot virus* e *Papaya meleira vírus*”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal do Centro de Ciências Humanas e Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biologia Vegetal na área de concentração Fisiologia Vegetal.

Aprovada em 25 de Fevereiro de 2015.

**COMISSÃO EXAMINADORA**



---

**Profa Dra Patrícia Machado Bueno Fernandes**  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal-UFES  
**Orientadora**



---

**Profa Dra Adelaide de Fátima Santana da Costa**  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal-UFES  
**Examinador Interno**



---

**Prof. Dr. Silas Pessini Rodrigues**  
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ  
**Examinador Externo**

## DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Marcelo, principal incentivador e exemplo de dedicação.

À minha mãe Luzia pelo apoio incondicional.

Aos meus irmãos, parceiros e amigos em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força, sustento e a paz que me concedeu em todos os momentos, sem ele esta realização não seria possível.

À Profa. Patricia Machado Bueno Fernandes pela orientação, apoio e ensinamentos.

Ao Prof. José Aires Ventura pela colaboração e disponibilidade em ajudar.

À Profa. Maria do Carmo Pimentel Batitucci pelo apoio durante esta jornada.

À Profa. Viviana Borges pelas dicas e discussões, durante as disciplinas, que auxiliaram no delineamento experimental.

Ao secretário Ricardo Celestino, sempre disposto a nos ajudar.

Aos professores do PPGBV.

Aos colegas do PPGBV, excelentes parceiros de trabalho.

Aos colegas do LBAA, obrigada pela parceria. Em especial, ao colega Jean pelo auxílio prestado neste trabalho.

A meu esposo, Marcelo, parceiro de todas as horas, meu maior incentivador e crítico, um exemplo de dedicação e amor à pesquisa.

A minha mãe, a mulher mais guerreira e batalhadora que já conheci. Obrigada pelo apoio que sempre me concedeu mesmo a 1000 quilômetros de distância, preocupando-se e incentivando-me nas conversas diárias ao telefone.

Ao meu pai Adail (*in memoriam*), que nunca conheci, mas que deixou um legado inestimável de caráter, trabalho e honestidade, no qual me inspiro e me inspirarei durante toda a minha vida.

Aos meus irmãos Amilto, Ivone, Ilda, Ilton, Lia (*in memoriam*), Léia e Débora que sempre me ajudaram em tudo. Amo vocês!!

À agência de fomento CAPES pelo apoio financeiro.

A todos os que me apoiaram e torceram por mim, meu muito obrigada!

## RESUMO

O mamoeiro (*Carica papaya* L.) é uma frutífera muito importante para o Estado do Espírito Santo, sendo este o segundo maior produtor e o maior exportador brasileiro de mamão. No entanto, as doenças meleira do mamoeiro e mosaico do mamoeiro, causadas respectivamente pelos vírus *Papaya meleira virus* (PMeV) e *Papaya ringspot virus-P* (PRSV-P), representam os principais fatores limitantes da produção. Quanto às sementes de *C. papaya*, estas são classificadas como intermediárias quanto à tolerância a dessecação, o tecido de reserva é constituído pelo endosperma e possui uma germinação assincrônica devido à presença de inibidores na região da sarcotesta. Sabe-se que a transmissão viral por sementes é uma via muito importante para a disseminação do PMeV em *C. papaya* cv. Maradol, já o PRSV-P não é tipicamente transmitido por esta via. Este trabalho objetiva avaliar a interferência dos referidos vírus (PMeV e PRSV-P) na germinação de sementes oriundas de plantas de *C. papaya* cv. Golden infectadas. Verificou-se que o vírus PMeV desencadeia redução na biomassa de sementes, na taxa de germinação, crescimento e biomassa das plantas, além de danificar a estrutura da superfície embrionária. Por sua vez, o vírus PRSV-P demonstrou não comprometer nenhum dos parâmetros avaliados. Conclui-se que o vírus PMeV compromete a formação e o desenvolvimento das sementes, já o vírus PRSV-P não acarreta nenhum prejuízo como verificado em PMeV.

**Palavras-chave:** Transmissão viral via sementes, *Papaya meleira virus*, *Papaya ringspot virus-P*, germinação e desenvolvimento vegetal, microscopia de força atômica

## ABSTRACT

The papaya (*Carica papaya* L.) is a fruit tree very important for the State of Espírito Santo, which is the second largest producer and the largest exporter of papaya in Brazil. However, the diseases papaya sticky disease (or meleira) and mosaic of papaya, caused, respectively, by *Papaya meleira virus* (PMeV) and *Papaya ringspot virus-P* (PRSV-P), are the main limiting factors. The seeds of *Carica papaya* are intermediate, for tolerance to desiccation, its reserve tissue is the endosperm, has asynchronous germination due to the presence of inhibitors in the sarcotesta region. It is known that viral transmission by seeds is a very important route for the spread of PMeV, and PRSV-P is not typically transmitted through this route. This study aims to evaluate if there is interference of PMeV and PRSV-P on the germination of seeds from infected plants. This research found that the PMeV causes the reduction of seeds biomass, germination rate, growth and biomass of the plants, and damage in the surface structure of the embryos. The PRSV-P virus demonstrated does not compromise any of the parameters. In conclusion, PMeV virus affect the formation and development of the seeds of infected papaya cv. Golden plants, and the PRSV-P virus does not cause any damage to seed as the PMeV virus does.

**Keywords:** Seeds transmission virus, *Papaya meleira virus*, *Papaya ringspot virus-P*, germination and plant development, Atomic Force Microscopy



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sintomas da meleira em frutos de <i>C. papaya</i> .....	21
Figura 2	Sintomas do mosaico (PRSV-P) em frutos de <i>C. papaya</i> .....	24
Figura 3	Ciclo parcial de vida das angiospermas.....	27
Figura 4	Representação esquemática de um corte longitudinal em uma semente de <i>C. papaya</i> .....	29
Figura 5	Representação esquemática do funcionamento do microscópio de força atômica (AFM).....	37
Figura 6	Exemplos de imagens formadas pelo Microscópio de Força Atômica (AFM).....	38
Figura 7	Imagem ilustrativa de embriões de <i>C. papaya</i> .....	45
Figura 8	Parte do teste de germinação de sementes de <i>C. papaya</i> .....	47
Figura 9	Parte do experimento realizado em casa de vegetação.....	48
Figura 10	Medições das plantas.....	49
Figura 11	Diagnóstico molecular para o vírus PRSV-P.....	51
Figura 12	Diagnóstico molecular para o vírus PMeV.....	52
Figura 13	Parte do teste tetrazólio realizado em semente de mamão.....	54
Figura 14	Diagramas de força-volume dos embriões de sementes secas....	57
Figura 15	Diagramas de força-volume dos embriões dois dias pós-semeadura.....	60
Figura 16	Diagrama de força-volume dos embriões quatro dias pós-semeadura.....	63
Figura 17	Etapas da germinação de sementes de <i>C. papaya</i> .....	77

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Porcentagem acumulada de germinação ao longo do tempo (dias).....	67
Gráfico 2	Número de plantas que sobreviveram ao longo dos 30 dias de medições.....	71
Gráfico 3	Número de folhas após 30 dias.....	72
Gráfico 4	Comprimento de raiz (centímetros) após 30 dias.....	73
Gráfico 5	Massa fresca (gramas) após 30 dias.....	74
Gráfico 6	Massa seca (gramas) após 30 dias.....	75

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência dos iniciadores desenhados para gene cp (AF344642.1/Gen Bank) do vírus PRSV- P.....	42
Tabela 2	Dados estatísticos relacionados à germinação.....	65
Tabela 3	Valores médios do crescimento caulinar nas três medições realizadas.....	68

## LISTA DE SIGLAS

ABA	Ácido Absísico
ADA	Água destilada autoclavada
AFM	Microscopia de força atômica (do inglês “Atomic Force Microscopy”)
AMV	<i>Alfafa mosaic vírus</i>
BRAPEX	Associação Brasileira de Produtores de Papaya
cDNA	DNA complementar
dsRNA	RNA de fita dupla (do inglês “double straight RNA”)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FVI	Diagrama de Força (do inglês “force-volume imaging”)
GA	Ácido Giberélico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IBRAF	Instituto Brasileiro de Frutas
IDAF	Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo
INCAPER	Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência técnica e Extensão Rural

IVG	Índice de Velocidade de Germinação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
nN	Unidade de força- nano Newtons
ObPV	<i>Obuda pepper vírus</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês “Polymerase Chain Reaction”)
PepMV	<i>Pepino mosaic vírus</i>
PMeV	<i>Papaya meleira vírus</i>
PRSV-P	<i>Papaya ringspot virus- type P</i>
S	Sadio
STM	Microscopia de tunelamento (do inglês “Scanning Tunneling Microscopy”)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
1.1	Cultura do mamoeiro.....	18
1.2	Características das doenças.....	19
1.2.1	<i>Papaya meleira virus</i> .....	19
1.2.2	<i>Papaya ringspot virus</i> .....	22
1.2.3	Medidas de controle no Espírito Santo.....	25
1.3	Desenvolvimento Vegetal.....	26
1.3.1	Caracterização das sementes.....	28
1.3.2	Regulação da germinação e crescimento.....	30
1.3.3	Teste de viabilidade.....	32
1.4	Transmissão de vírus através da semente.....	33
1.4.1	Interferência da infecção por vírus na germinação e no desenvolvimento.....	34
1.5	Microscopia de Força Atômica e suas aplicabilidades.....	36
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
2.1	Objetivo Geral.....	40
2.2	Objetivos Específicos.....	40
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
3.1	Delineamento Experimental.....	41

3.2	Obtenção dos frutos e folhas.....	41
3.3	Diagnóstico molecular.....	42
3.4	Coleta e processamento das sementes de <i>C. papaya</i> .....	43
3.5	Teste de viabilidade das sementes de <i>C. papaya</i> utilizando o reagente Cloreto de tetrazólio.....	43
3.6	Preparação dos embriões de <i>C. papaya</i> para análise por microscopia de força atômica.....	44
3.7	Teste de germinação.....	46
3.8	Transferência das sementes germinadas para casa de vegetação.....	47
3.8.1	Avaliação do desenvolvimento das plântulas.....	49
3.9	Tratamento estatístico.....	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1	Diagnóstico Molecular.....	51
4.2	Teste de viabilidade.....	53
4.3	Microscopia de Força Atômica nos embriões de <i>C. papaya</i> .....	55
4.4	Avaliação da germinação e desenvolvimento das plântulas....	64
4.4.1	Avaliação da biomassa das sementes.....	64
4.4.2	Taxa de germinação.....	66
4.4.3	Análise do crescimento caulinar.....	68
4.4.4	Sobrevivência.....	70

4.4.5	Avaliação do número de folhas.....	72
4.4.6	Avaliação do comprimento das raízes.....	73
4.4.7	Biomassa.....	74
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>79</b>
	<b>ANEXO 1 – Protocolo de extração de ácidos nucleicos.....</b>	<b>87</b>



## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país com proporções continentais, com 8.511.965 km<sup>2</sup> de extensão. Em função disso, seu território abrange uma heterogeneidade de climas que favorece uma diversificação no cultivo de frutíferas. Sendo cultivadas frutíferas de clima (A) quente e úmido, (B) semiárido, (C) temperado e (D) temperado-frio; segundo a classificação de Koeppen e Geiger (1928). Estes fatores contribuem para que o Brasil seja o segundo maior produtor de frutas no mundo (MANICA et al., 2006). De acordo com o Instituto Brasileiro de Frutas (IBRAF, 2012), em 2012 o país produziu 43,6 milhões de toneladas de fruto. Por isso, atualmente este ocupa o patamar de 12º maior exportador mundial.

No que tange ao Estado do Espírito Santo, o mesmo possui um grande potencial para a fruticultura, devido às condições climáticas favoráveis e à sua localização estratégica (próximas aos grandes centros consumidores). Apesar do território estadual representar apenas 0,5% do território nacional, em 2012 o Espírito Santo foi o oitavo maior exportador e o décimo maior produtor de frutas frescas, com volume de produção de 1.176 milhões de toneladas (IBRAF, 2012). Algumas destas frutíferas, devido à sua qualidade comercial, alcançaram grande destaque na produção do estado das últimas décadas: o abacaxi, o mamão e o coco (INCAPER, 2014).

O mamoeiro (*Carica papaya*) é uma dicotiledônea pertencente à família Caricaceae. É uma das frutíferas de maior produção na América Tropical, sendo também cultivada na África Tropical, Havaí, Austrália, Ilhas Canárias (Espanha) e Ilha da Madeira (MANICA et al., 2006). As variedades e híbridos de mamoeiro cultivados comercialmente pertencem a dois grupos heteróticos distintos, Solo e o Formosa. As cultivares do grupo Solo são caracterizadas por possuírem frutos menores (de 400 a 600 gramas). Já as cultivares do grupo Formosa apresentam frutos maiores (de 800 a 1100 gramas) e geralmente são híbridos, podendo se destacar o Tainung 1, amplamente plantado no Brasil e o Maradol na América Central, com grande expressão no México (CARDOSO, 2012).

O Estado de São Paulo foi o maior produtor brasileiro desta frutífera até meados da década de 70. Porém, após este período, uma forte incidência do vírus *Papaya*

*ringspot virus* (mosaico do mamoeiro) no estado ocasionou a migração do cultivo do mamão para outros estados. Atualmente, os maiores produtores nacionais são os estados da Bahia e do Espírito Santo, que juntos representam mais de 70% das áreas de cultivo nacionais. O sucesso da cultura nestas regiões ocorreu em função do desenvolvimento de rigorosas técnicas para o controle de doenças (RUGGIERO et al., 2011).

No Brasil, a produção nacional do mamão, no ano de 2012, foi de 1,85 milhões de toneladas (IBRAF, 2012; INCAPER, 2014), número que o torna o segundo maior produtor mundial, perdendo apenas para a Índia. Neste mesmo ano, o país exportou 26,1 mil toneladas da fruta, gerando uma receita de 36 milhões de dólares (IBRAF, 2012). Deste montante, o Espírito Santo obteve uma participação significativa, pois produziu 560 mil toneladas e exportou 12,4 mil toneladas, o que representa 50% do volume total de exportação do fruto (BRAPEX, 2014). Tais valores tornam o estado o segundo maior produtor nacional da fruta – perdendo apenas para a Bahia – e também o maior exportador. A produção de mamão no estado concentra-se na Região Norte, especialmente nos municípios de Linhares, Aracruz, Sooretama, Jaguaré, Nova Venécia, São Mateus, Boa Esperança, Conceição da Barra, Pinheiros, Pedro Canário, Montanha e Mucuri.

A importância comercial desta frutífera, por sua vez, reside na comercialização do fruto *in natura* e de enzimas como papaína e a peptina, extraídas do látex do mamoeiro. Estas enzimas são muito utilizadas na indústria têxtil, farmacêutica, alimentícia e cosmética (MANICA et al., 2006). A papaína, por exemplo, é utilizada como amaciante de carnes e, na indústria de bebidas, é empregada na clarificação de cervejas (ANDRADE-MAHECHA et al., 2011).

## 1.1. Cultura do mamoeiro

A principal característica dessa cultura é a possibilidade de se obter um grande número de plantas por hectare, que confere a cultura uma alta produtividade, isto é, uma maior produção em menores áreas de cultivo. Além disto, o desenvolvimento do mamoeiro é rápido, a propagação é feita por meio de sementes e a planta apresenta uma alta e contínua produção. Tais características incidem em benefícios no cultivo desta planta para o produtor (MANICA et al., 2006). Todavia, alguns fatores corroboram negativamente na redução da produtividade e da qualidade dos frutos. A incidência de doenças, especialmente virais e fúngicas, são consideradas os principais fatores prejudiciais e limitantes da cultura de mamoeiro no Brasil (LIMA et al., 2001). Dentre estas doenças, destacam-se a Antracnose (fungo *Colletotrichum gloeosporioides*) e as viroses mosaico do mamoeiro ("*Papaya ringspot virus*- type p- PRSV-P"), meleira do mamoeiro (*Papaya meleira virus*- PMeV) e Amarelo letal do mamoeiro (*Papaya lethal yellowing virus*) (MANICA et al., 2006). Neste capítulo introdutório são caracterizados os vírus "*Papaya ringspot virus*- type p" (PRSV-P) e *Papaya meleira virus* (PMeV), uma vez que representam objetos de investigação do presente estudo.

## 1.2. Caracterização das doenças

### 1.2.1. *Papaya meleira virus*

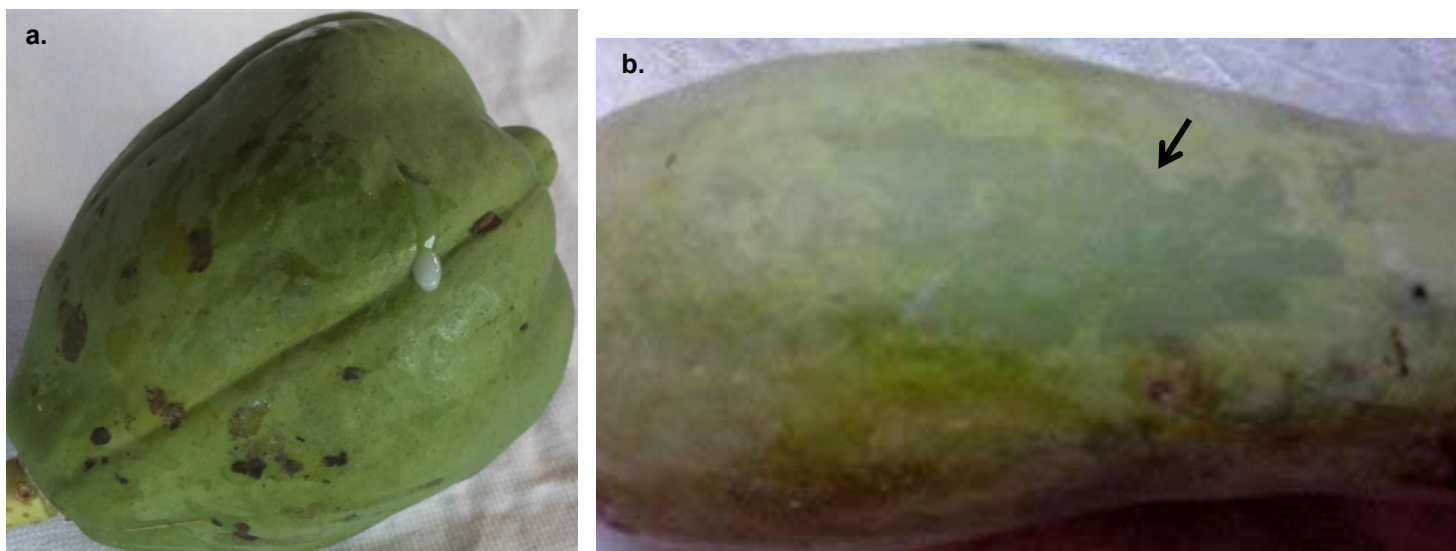
A meleira do mamoeiro é uma doença causada pelo vírus *Papaya meleira virus* (PMeV). Sendo considerado um dos principais problemas fitossanitários da cultura do mamoeiro (MANICA et al., 2006). Os primeiros relatos da doença ocorreram em meados da década de 80, nos estados do Espírito Santo e Bahia (LIMA et al., 2001). A partir de então, em poucos anos, a doença disseminou-se, atingindo os estados de Pernambuco e Ceará. Atualmente encontra-se, principalmente, nos estados do Espírito Santo, Bahia, Pernambuco, Ceará, Paraíba, Rio Grande do Norte e Minas Gerais (DALTRO et al., 2014). Até o ano de 2012, a presença do vírus havia sido relatada apenas no território brasileiro, porém neste mesmo ano, o vírus foi detectado também em mamoeiros no México (PEREZ-BRITO et al., 2012).

O vírus da meleira, PMeV, é constituído por uma partícula isométrica com aproximadamente 50nm de diâmetro, e seu genoma é composto por uma única molécula de RNA fita dupla com aproximadamente 12.000 pares de bases (pb) (ZAMBOLIM et al., 2003). O PMeV ainda não foi classificado, ou incluído, em nenhuma das famílias de vírus conhecidas, além disso pouco se sabe acerca de sua sequência e organização genômica. Entretanto, em uma análise comparativa de um fragmento da replicase – com aproximadamente 560 pb – obtido a partir de isolados do vírus PMeV coletados nos principais estados produtores brasileiros, revelou uma semelhança deste com o mycoviruses da família *Totiviridae* (ARAUJO et al., 2007; DALTRO et al., 2014). No entanto, um posicionamento taxonômico conclusivo apenas será possível quando o genoma completo for sequenciado.

O surgimento dos sintomas da doença ocorre somente após a floração, quando a planta tem aproximadamente seis meses de idade. Até este período o mamoeiro doente representa um reservatório para a transmissão do vírus, pois a detecção e consequente controle do mesmo tornam-se inviabilizados. Os sintomas da doença caracterizam-se pela intensa e espontânea exsudação de látex (aquoso e translúcido) nos frutos, surgimento de pequenas lesões necróticas (coloração marrom-claro) nas pontas das folhas jovens e, também, o aparecimento de manchas zonadas nos frutos (LIMA et al., 2001) (**Figura 1**). Estes sintomas, segundo estudos

moleculares e microscópicos, ocorrem devido às partículas virais que se encontram fortemente aderidas aos polímeros presentes no látex, possivelmente como um mecanismo de proteção ou auxílio ao transporte viral (RODRIGUES et al., 2005).

Atualmente pouco se conhece acerca dos mecanismos de transmissão deste vírus (PMeV), bem como o envolvimento de vetores transmissores, o que dificulta o controle da disseminação da doença (RODRIGUES, et al., 2009). Quanto à transmissão via semente, Abreu et al. (2012) investigaram a transmissão do PMeV por sementes de *C. papaya* cultivar Golden. Sendo que ao avaliarem plântulas oriundas de sementes de plantas infectadas, obteve-se resultado negativo para a presença do vírus PMeV, concluiu-se então no referido trabalho que o vírus PMeV não é transmitido pela semente. Todavia, outro estudo realizado com sementes de *C. papaya* cultivar Maradol demonstrou que a transmissão por sementes ocorre e representa uma importante via de disseminação do PMeV. Esta constatação inclusive auxiliou os pesquisadores na compreensão de como o referido vírus surgiu e infectou mamoeiros no México (TAPIA-TUSSELL et al., 2014).



**Figura 1:** Sintomas da meleira em frutos de *C. papaya*. **a.** exsudação do látex; **b.** manchas zonadas.

### 1.2.2. *Papaya ringspot virus*

O mosaico do mamoeiro é uma doença causada pelo vírus *Papaya ringspot virus* (PRSV-P), também conhecida como doença da mancha anelar. É considerada a doença do mamoeiro mais importante no mundo, sendo relatada em praticamente todas as regiões onde a frutífera é cultivada (TRIPATHI et al., 2008). O primeiro relato da doença ocorreu no Havaí em meados da década de 20. Em 1969, no Estado de São Paulo, a doença foi reportada pela primeira vez no Brasil, desde então se propagou por várias áreas de cultivo, inclusive no Estado do Espírito Santo (LIMA et al., 2001). Em 2012, o vírus atingiu severamente as principais regiões produtoras do estado, contribuindo fortemente para a queda da produção e do volume de exportação nacional em 9,3% (IBRAF, 2012).

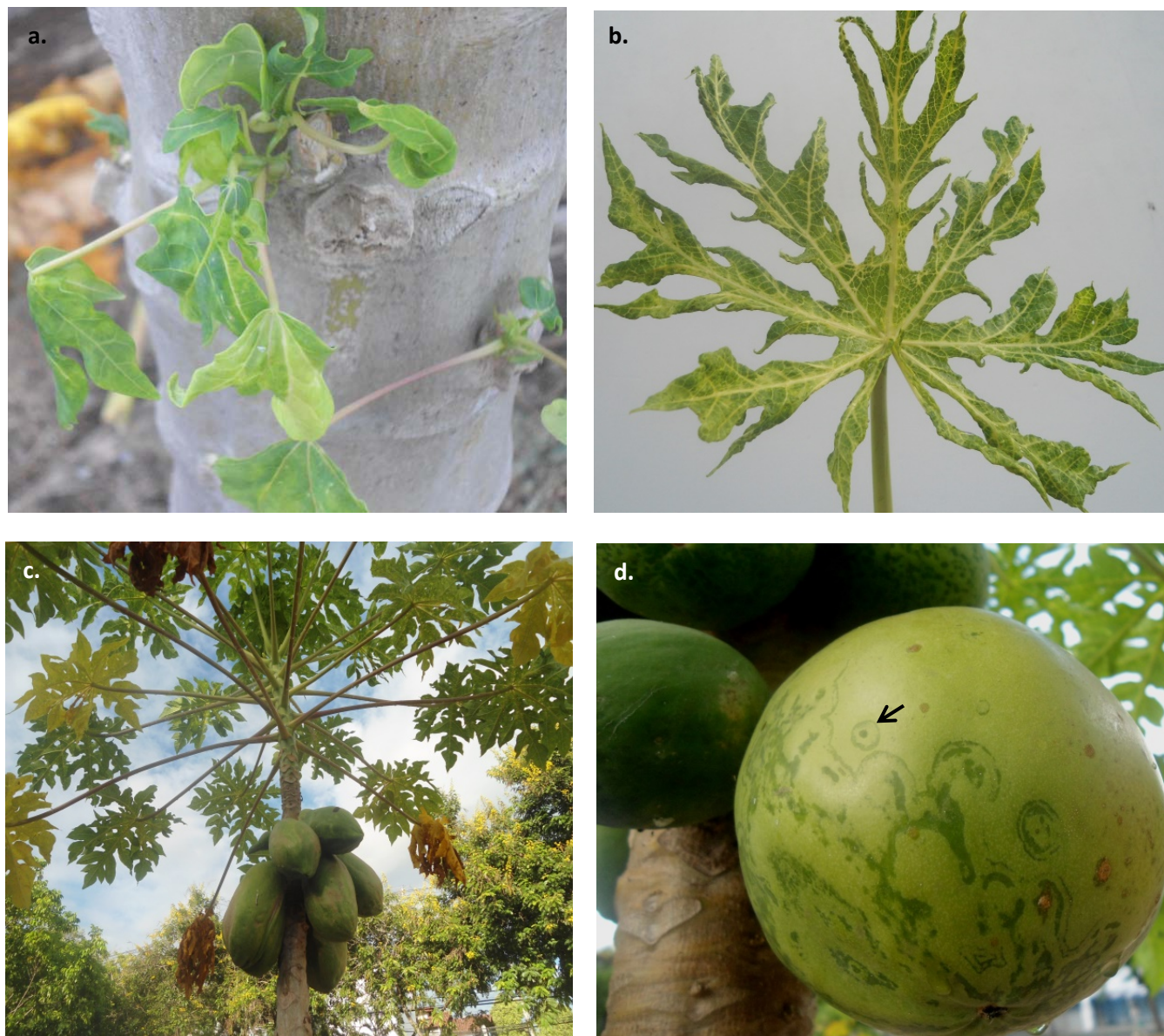
O *Papaya ringspot virus* é agrupado em duas estirpes distintas: o *Papaya ringspot virus*- type p (“papaya”), responsável por infectar mamoeiros e cucurbitáceas, e o *Papaya ringspot virus*- type w (“watermelon”), que infecta apenas cucurbitáceas. Ademais existe uma variação na susceptibilidade das espécies de cucurbitáceas à infecção natural ou experimental do PRSV-P (MANSILLA et al., 2013). O PRSV pertence à família *Potyviridae* e ao gênero *Potyvirus*, sendo que este gênero integra um grupo de viroses muito importantes economicamente para agricultura mundial. O vírus é constituído por uma partícula viral filamentosa e flexível medindo 780x12nm, e o seu genoma é composto por RNA fita simples senso positivo contendo 10.326 pb, revestido pela proteína capsidial [“coat protein”- cp] (YEH et al., 1992).

A transmissão deste vírus ocorre por meio de insetos vetores: os afídeos (*Myzus persicae*, *Aphis gossypii*, *Aphis fabae*, *Aphis coreopsidis*, *Aphis sp.* e *Toxoptera citricidus*) (MANICA et al., 2006). Estas espécies de afídeos não colonizam mamoeiros sendo, então, o vírus transmitido por meio da picada de prova de maneira não persistente. De tal forma, o vírus fica restrito ao estilete, não replicando no inseto vetor (TRIPATHI et al., 2008). Quanto à transmissão do PRSV-P por sementes, segundo Tripathi et al. (2008), este vírus não utiliza desta via de disseminação.

A referida doença manifesta-se no mamoeiro através do amarelecimento das folhas jovens, sintoma este que mais tarde exhibe um aspecto de mosaico, com regiões verdes junto a regiões amarelas, além disso, as folhas doentes também podem

apresentar intensas deformações e bolhas. Nos frutos surgem manchas que tomam a forma de anéis concêntricos bem nítidos que, em estágios mais avançados, podem se tornar necrosados e esbranquiçados (**Figura 2**).





**Figura 2:** Sintomas do mosaico (PRSV-P) em frutos de *C. papaya*. **a.** amarelecimento das folhas jovens; **b.** mosaico nas folhas doentes; **c.** planta doente; **d.** manchas anelares do fruto (indicada por seta).

### 1.2.3 Medidas de controle no Espírito Santo

O sucesso da cultura de mamão no Estado do Espírito Santo ocorreu em função da implantação de programas de acompanhamento técnico e do monitoramento de lavouras, em conjunto com desenvolvimento de tecnologias de manejo e controle de pragas no mamoeiro (INCAPER, 2015).

Algumas ações realizadas no estado, com a finalidade de evitar a disseminação de doenças, como a Meleira e Mosaico, foram muito bem sucedidas. Um exemplo é a realização de inspeções semanais nos pomares, que resultam na eliminação das plantas doentes (“rouguing”), caso os sintomas sejam detectados (MANICA et al., 2006).

A legislação nacional e estadual visam conter esta disseminação. A Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura, pela Portaria N°134, de 17 de novembro de 1997, determina a interdição de propriedades no Espírito Santo, quando comprovada a presença de meleira, por meio de diagnóstico oficial, até que ocorra a eliminação das plantas infectadas. A legislação nacional específica do Ministério da Agricultura, Instrução normativa nº 04 de 01/03/2002, também determina a imediata erradicação das plantas doentes, mediante diagnóstico (MANICA et al., 2006).

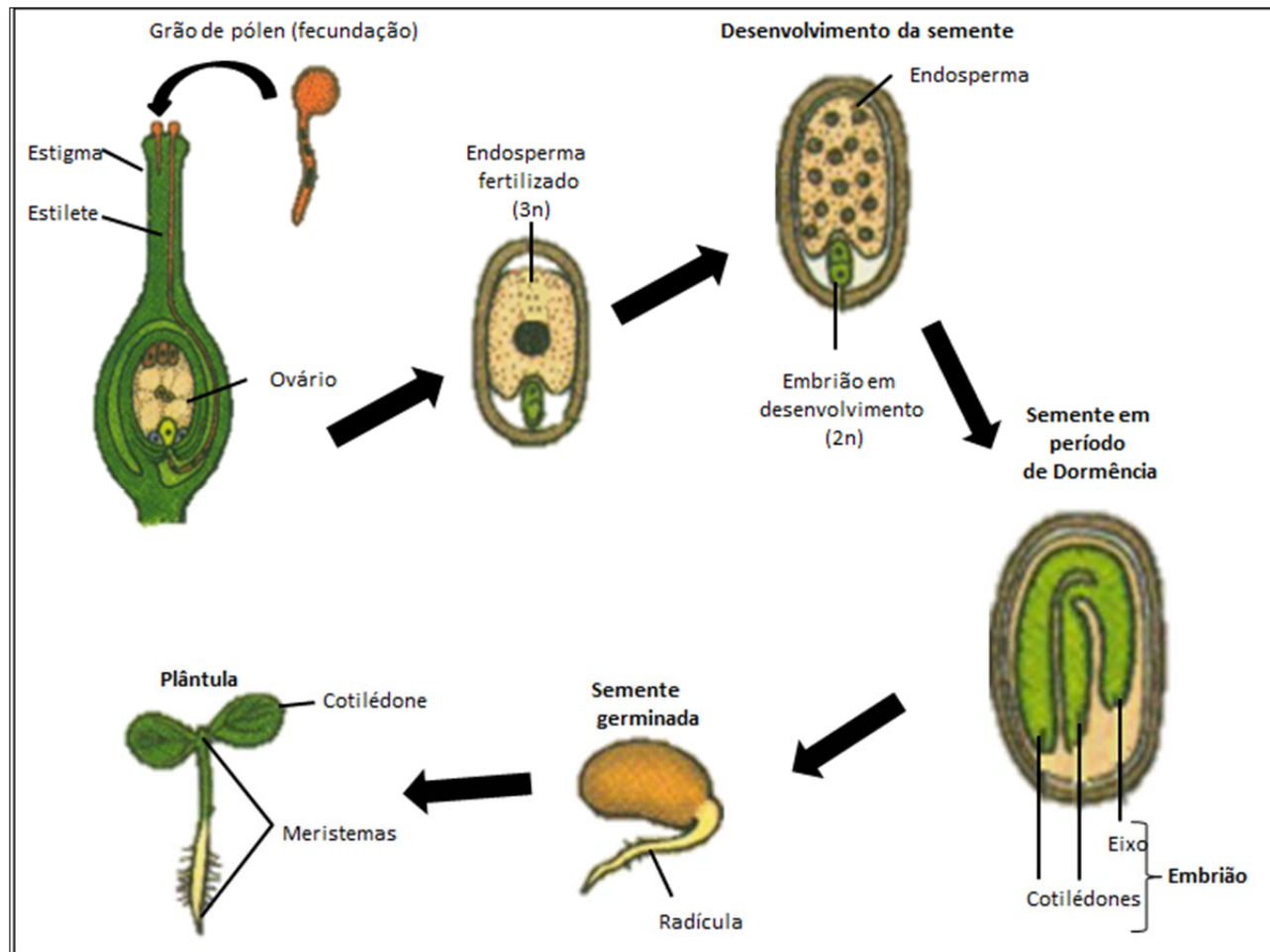
Além disso, a partir de 2012, a necessidade de aumentar o controle sobre as viroses motivou a assinatura de um termo de cooperação técnica entre a Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Papaya (Brapex) e os órgãos fiscalizadores estaduais, inclusive o Instituto de Defesa Agropecuária e Florestal do Espírito Santo (IDAF) (IBRAF, 2012).

### 1.3. Desenvolvimento vegetal

Pretende-se por meio do presente tópico apresentar uma revisão compacta acerca do desenvolvimento vegetal das espermatófitas (plantas que produzem sementes). Tal desenvolvimento compreende três etapas principais: a embriogênese, o desenvolvimento vegetativo e o desenvolvimento reprodutivo. Nesta revisão, abordar-se-á apenas as duas primeiras etapas citadas.

A embriogênese consiste na formação de um embrião maduro multicelular a partir da fecundação do óvulo ( $n$ ) pelo grão de pólen ( $n$ ), originando o zigoto ( $2n$ ) – o endosperma também é fecundado concomitantemente, formando um tecido triploide – que sofre sucessivas divisões mitóticas (GOLDBERG et al., 2012). Ao final do período da embriogênese, o embrião e o endosperma encontram-se completamente formados (**Figura 3**). A partir de então, ocorrem inúmeras modificações fisiológicas, especialmente nos tecidos embrionários, como a perda de água, interrupção da transcrição gênica e da síntese de proteínas. Tais modificações ocasionam a inibição completa da atividade germinativa, iniciando assim o processo de dormência da semente (TAIZ; ZEIGER, 2013). Este é fundamental para garantir a propagação das plantas, pois representa um modo de adaptação que torna o embrião apto/viável e capaz de resistir a longos períodos de condições adversas, como secas e altas temperaturas (TAIZ; ZEIGER 2013).

No entanto, quando a semente é submetida a condições favoráveis para a germinação – como umidade e luminosidade ideais – o embrião quebra este estado de dormência por meio da mobilização das reservas armazenadas nos cotilédones ou no endosperma, dando início ao processo de desenvolvimento vegetativo (GOLDBERG et al., 2012). Por sua vez, a partir da mobilização destas reservas, a plântula constrói sua forma rudimentar, por meio da atividade meristemática apical, lateral e radicular (**Figura 3**). Com o desenvolvimento da parte aérea, a planta torna-se fotossinteticamente capaz de propiciar, assim, o posterior crescimento (TAIZ; ZEIGER 2013).



**Figura 3:** Ciclo parcial de vida das angiospermas, com ênfase no desenvolvimento da semente e no processo de germinação. [Adaptado de GOLDBERG *et al.* (2012)].

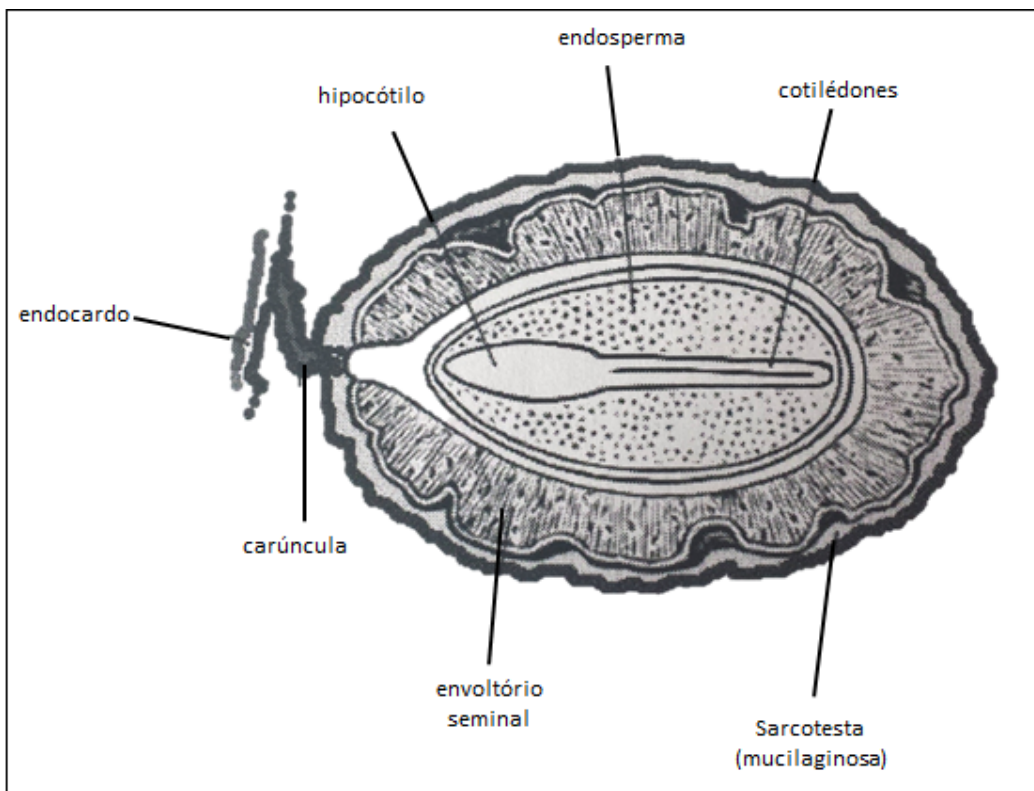
### 1.3.1. Caracterização das sementes

Roberts (1973) definiu duas categorias para as sementes – quanto à tolerância para dissecação: ortodoxas e recalcitrantes. As sementes ortodoxas suportam longos períodos de dissecação (de 5 a 2% de umidade). Sendo que, sob tais condições, estas sementes podem ser armazenadas por entre 2 e 10 anos (dependendo da espécie) sem que ocorra perda da viabilidade; além de sobreviverem também a baixas temperaturas. As sementes recalcitrantes, por sua vez, não sobrevivem a dissecações e baixas temperaturas, sendo que o limite de umidade para a manutenção da viabilidade destas sementes é entre 12 e 30% – de acordo com a espécie. Esta característica, peculiar à referida categoria de sementes, torna-se um desafio à manutenção de sua viabilidade em estoques e bancos de germoplasma (ROBERTS, 1973).

Posterior à classificação de Roberts (1973), Ellis et al. (1990) identificaram uma categoria intermediária de sementes, entre as ortodoxas e as recalcitrantes (HONG; ELLIS, 1996), sendo que, nesta categoria, enquadram-se as sementes de *C. papaya* (ALTHOFF; CARMONA, 1999). As sementes de mamoeiro não são ortodoxas, nem recalcitrantes, portanto, suportam a dissecação por um período mais curto, quando comparadas às ortodoxas (ELLIS et al., 1990). Althoff e Carmona (1999) constataram que as sementes de mamão suportam dissecações de até 4,5% de umidade sem que ocorra perda significativa da viabilidade. Além disso, o referido estudo também verificou que o método de estocagem mais eficiente para estas sementes é configurado na utilização de embalagens de papel para o armazenamento à temperatura ambiente. Este método propicia a manutenção significativa da viabilidade por até 24 meses (ALTHOFF; CARMONA, 1999).

Anatomicamente, a semente de mamão é constituída por sarcotesta, envoltório seminal, carúncula, endocarpo, hipocótilo, endosperma e cotilédones (**Figura 4**). A sarcotesta é um tecido membranoso externo, rico em mucilagem que, por sua vez, reveste o envoltório seminal ou testa. O envoltório seminal é a camada mais rígida da semente, rica em polissacarídeos (RODRIGUES, 2006). A carúncula (região da micrópila) tem a função de conectar o endocarpo às demais partes da semente. Já o hipocótilo e os cotilédones formam a região embrionária da semente. Quanto ao

endosperma, este constitui o tecido de armazenamento das reservas que são recrutadas durante a germinação.



**Figura 4:** Representação esquemática de um corte longitudinal em uma semente de *C. papaya*. [Retirada de RODRIGUES (2006) p. 44]

As etapas da germinação das sementes a partir da semente seca, que permanece em estado de dormência (condições de estocagem) com o percentual de umidade e o metabolismo celular reduzidos, ocorrem da seguinte forma, após as sementes serem submetidas às condições para germinação, como umidade e luminosidade, observa-se um aumento da turgidez da testa e do diâmetro da semente. Posteriormente, ocorre o início da quebra do estado de dormência e o rompimento parcial da testa, a partir da região da micrópila. A partir de então se inicia a protusão e crescimento da radícula (raiz embrionária) e o consecutivo desenvolvimento da raiz pivotante e das raízes laterais e, finalmente, o início da formação das folhas primárias a partir dos cotilédones (RAVEN et al., 2014).



### 1.3.2. Regulação da germinação e crescimento

Como esboçado anteriormente, o desenvolvimento vegetal é um processo programado que envolve a formação e germinação das sementes, maturação e frutificação das plantas. A germinação ocorre após a quebra da dormência, por meio da modulação de reguladores celulares (hormônios) e fatores ambientais, como oxigênio e luminosidade (TAIZ; ZEIGER, 2013). Este processo, no entanto, pode ser retardado ou prejudicado em função da presença de inibidores. Em sementes de *C. papaya*, os inibidores (principalmente compostos fenólicos) estão presentes especialmente na região da testa e da sarcotesta. Segundo Salomão e Mundim (2000), estes são responsáveis pela germinação lenta e assíncrona das sementes de *C. papaya*. Pesquisas relatam que a remoção da sarcotesta, a lavagem e a secagem das sementes são ações fundamentais para reduzir a atuação destes inibidores sobre a germinação (CARRILLO-CASTAÑEDA et al., 2013; SALOMÃO; MUNDIM, 2000). A literatura também reporta que, além da retirada da sarcotesta e da lavagem, o armazenamento e a implementação de tratamentos hormonais como ácido giberélico (GA) também podem aumentar a eficiência da germinação em *C. papaya* (PAZ; VÁZQUEZ-YANES, 1998; TOKUHISA et al., 2007).

A regulação hormonal da germinação é feita principalmente pela atuação antagônica de dois hormônios: ácido absísico (ABA) e ácido giberélico (GA). Em muitas espécies as quantidades relativas destes dois hormônios determinam o grau de dormência da semente (TAIZ; ZEIGER, 2013). Estudos demonstram que tratamentos com o aumento de luminosidade e umidade promovem a redução da concentração de ABA e o consequente aumento de GA nas sementes, finalizando assim a dormência e promovendo a germinação (RENNER et al., 2007).

O ABA é um hormônio responsável pela maturação e dormência de sementes, importante para broquear a germinação precoce. Além disso, promove a tolerância à dissecação, através da gradativa perda de água e acúmulo de moléculas de carboidrato e proteínas na semente. Acredita-se que estas moléculas se interajam para formar um estado cristalino que limita a ocorrência de reações químicas (TAIZ; ZEIGER, 2013). Sabe-se, também, que o ABA tem papel importante no aumento da tolerância ao estresse ocasionado por infecções virais, uma vez que se verificou um aumento da concentração deste hormônio em plantas infectadas (FRASER;

WHENHAM, 1982). Porém, os mecanismos de ação do ABA, mediante tais infecções virais, ainda são pouco conhecidos e, além disso, podem variar de acordo com o tipo de vírus e o nível da infecção (ALAZEM; LIN, 2014). Em estudos realizados verificou-se que o ABA pode ser responsável pela deposição de um polissacarídeo (calose) que limita a movimentação do vírus (FRASER, WHENHAM, 1989; ALAZEM; LIN, 2014; ALAZEM et al., 2014).

Por sua vez, o GA é responsável por propiciar germinação de sementes, por meio da indução à síntese de enzimas hidrolíticas, como amilases e proteases, responsáveis pela degradação das reservas nutricionais acumuladas no endosperma ou nos cotilédones. Esta quebra de carboidratos e proteínas de reserva possibilita a nutrição energética do embrião para que tenha início a germinação (TAIZ; ZEIGER, 2013). Após a germinação, o crescimento inicial das plântulas ocorre pela diferenciação dos meristemas apicais e laterais, que são modulados principalmente pela ação dos hormônios, como auxinas, citocininas, giberilinas (GA) e brassinoesteróides. As citocininas são responsáveis pela proliferação celular, enquanto que as giberilinas promovem o alongamento celular. Os brassinoesteróides atuam tanto na proliferação quanto no alongamento celular, já as auxinas estão envolvidas em todas as etapas do crescimento (DEPUYDT; HARDTKE, 2011).



### 1.3.3. Teste de viabilidade

Um dos testes mais utilizados em trabalhos científicos para avaliar a viabilidade de lotes de sementes é o Trifenil Cloreto de Tetrazólium ou Teste Tetrazólio (GAUR; SHARMA, 2014). A vantagem da aplicação destes testes é a rapidez na obtenção dos resultados e a possibilidade de distinguir, ou determinar, a qualidade fisiológica de lotes de sementes (SOUZA et al., 2010). Este se baseia na alteração da coloração dos tecidos vivos da semente à medida que entram em contato com a solução de sal tetrazólio (GASPAR-OLIVEIRA et al., 2010).

A alteração nos tecidos ocorre através da reação de redução do Trifenil Cloreto de Tetrazólium pelas enzimas desidrogenases, responsáveis pela catalisação da respiração mitocondrial (SOUZA et al., 2010). Tal reação gera um produto denominado formazam, de cor vermelho-carmim, com isso, tecidos mortos ou deteriorados não são corados e os tecidos vivos são corados de vermelho carmim ou rosa (FOGAÇA et al., 2006).

#### 1.4. Transmissão de vírus através da semente

A transmissão via semente é uma das estratégias de disseminação utilizada pelos vírus, entretanto, a frequência de transmissão por tal meio é reduzida, representando aproximadamente 18% dos casos (JOHANSEN et al., 1994). Apesar da baixa taxa de incidência da transmissão pela referida via, esta é importante uma vez que possibilita a transmissão viral a partir da germinação das sementes infectadas. Segundo Hull (2013), tal via de transmissão pode contribuir para a manutenção e sobrevivência do vírus, tendo em vista que possibilita a inserção dos vírus no estágio inicial da cultura.

A referida transmissão pode ocorrer por intermédio de duas formas distintas, quanto à localização do vírus: quando este aloja-se na testa e/ou quando aloja-se no embrião/endosperma. Os vírus restritos à testa não apresentam uma transmissão eficiente, pois o contato entre o vírus e a plântula emergente pode não ocorrer se, por exemplo, a testa se separar da semente antes do surgimento das plântulas, como ocorre com a alfafa. Ademais, nestas circunstâncias, poucos vírus são suficientemente estáveis para suportar a exposição à dissecação e estocagem das sementes (JOHANSEN et al., 1994). Quanto aos vírus restritos ao embrião/endosperma, a infecção ocorre de forma mais eficiente. Porém, segundo Johansen et al. (1994), a maioria dos vírus apresenta uma inabilidade na sobrevivência durante a maturação das sementes, fator que resulta na inativação viral. Uma das estratégias virais para garantir a sobrevivência durante este período é extinguir, ou reduzir, a sua multiplicação na fase de maturação e estoque das sementes e, por sua vez, apenas reiniciá-la quando o metabolismo das células embrionárias infectadas aumentar, durante a germinação (HUNTER et al., 1993; IRWIN et al., 1981). Caso o vírus sobreviva durante todo o processo de maturação e estocagem das sementes, sabe-se que a infecção pode perdurar por um longo período, garantindo assim a sobrevivência e manutenção dos vírus.

O mecanismo de acesso dos vírus à região embrião/endosperma ainda permanece obscuro, no entanto, presume-se que possa ocorrer por meio da infecção viral dos tecidos reprodutivos (como óvulo e megásporo), antes do início da embriogênese. Todavia, discute-se que este acesso também pode ser promovido por meio da

invasão viral do embrião/endosperma em algum estágio da embriogênese (JOHANSEN et al., 1994).

Em relação ao vírus PMeV, Tapia-Tussell et al. (2014) observaram que a incidência do vírus foi encontrada em maior abundância (83% das amostras) na região da testa e menos abundante (50% das amostras) em amostras de embrião/endosperma, revelando, assim, que este vírus utiliza das duas formas de transmissão por meio da semente.

#### **1.4.1. Interferência da infecção por vírus na germinação e no desenvolvimento de plântulas**

Os fatores que impactam a planta mãe, como estresses ambientais e fitopatológicos, podem resultar em alterações nas características de germinação da progênie (sementes) e na viabilidade das plântulas (BARKIN; BASKIN, 2014). Algumas pesquisas (KAZINCZI et al., 2006; 2000; TAPIA-TUSSELL et al., 2014) revelaram que as viroses afetam a germinação e o desenvolvimento da progênie (sementes). Estudo realizado por Kazinczi et al. (2006) com sementes de plantas de *Solanum nigrum* infectados com os vírus *Obuda pepper virus* (ObPV) e com o *Pepino mosaic virus* (PepMV) – não transmitidos via sementes – revelaram que não houve perda significativa da viabilidade, porém a produção de sementes e a porcentagem de germinação foram inferiores em comparação às plantas saudáveis. Além disto, as infecções com os respectivos vírus foram responsáveis pelo aumento do período de dormência das sementes.

Outro estudo, realizado por Kazinczi et al. (2000), verificou a redução na porcentagem de germinação de 15, 21 e 6%, respectivamente, nas sementes de *Chenopodium album*, *Chenopodium murale* e *Chenopodium quinoa*, derivadas de plantas infectadas com vírus do gênero *Sobemovirus*, tipicamente transmitidos pela semente. Com relação às sementes de alfafa oriundas de plantas infectadas com o vírus *Alfafa mosaic virus* (AMV), por sua vez, verificou-se uma redução de 31-35% na germinação e de 45-68% na produção de uma planta adulta (HEMMATI; MC LEAN, 1977). Quanto às pesquisas realizadas com *C. papaya*, Tapia-Tussell et al. (2014) verificaram uma redução de 32% na germinação de sementes de plantas

com PMeV em relação à germinação de sementes de plantas saudáveis. Ademais, o referido trabalho relatou também que as plantas saudáveis apresentaram maior crescimento da parte aérea e maior desenvolvimento dos frutos, em relação às plantas doentes proveniente de sementes infectadas.

Além de afetar a germinação, o desenvolvimento das plântulas – obtidas a partir de sementes de plantas infectadas – também é prejudicado quando comparado ao das plântulas de origem saudável. Segundo Gaur e Sharma (2014), a massa seca de *Solanum nigrum* germinadas a partir de sementes de plantas infectadas com o vírus *Tabacco mosaic virus* reduziu de 30 a 80%, devido ao crescimento caulinar e radicular inferior. Outras alterações fisiológicas, associadas aos efeitos da infecção viral sobre sementes de origem infectada (oriundas de plantas infectadas), também foram reportadas na literatura tais como a redução dos pigmentos, alterações nos processos fotossintéticos, diminuição da resistência à seca e redução na captação de nutrientes (KAZINCZI et al., 2001; 2002).

## 1.5. Microscopia de Força Atômica e suas aplicabilidades

A microscopia de força atômica é uma técnica que vem sendo amplamente empregada em análises biológicas, como na investigação da força adesão na superfície de proteínas (VERBELEN; DUFRÊNE, 2009). Assim sendo, neste tópico será feita uma revisão acerca do histórico, dos fundamentos e da aplicabilidade da técnica.

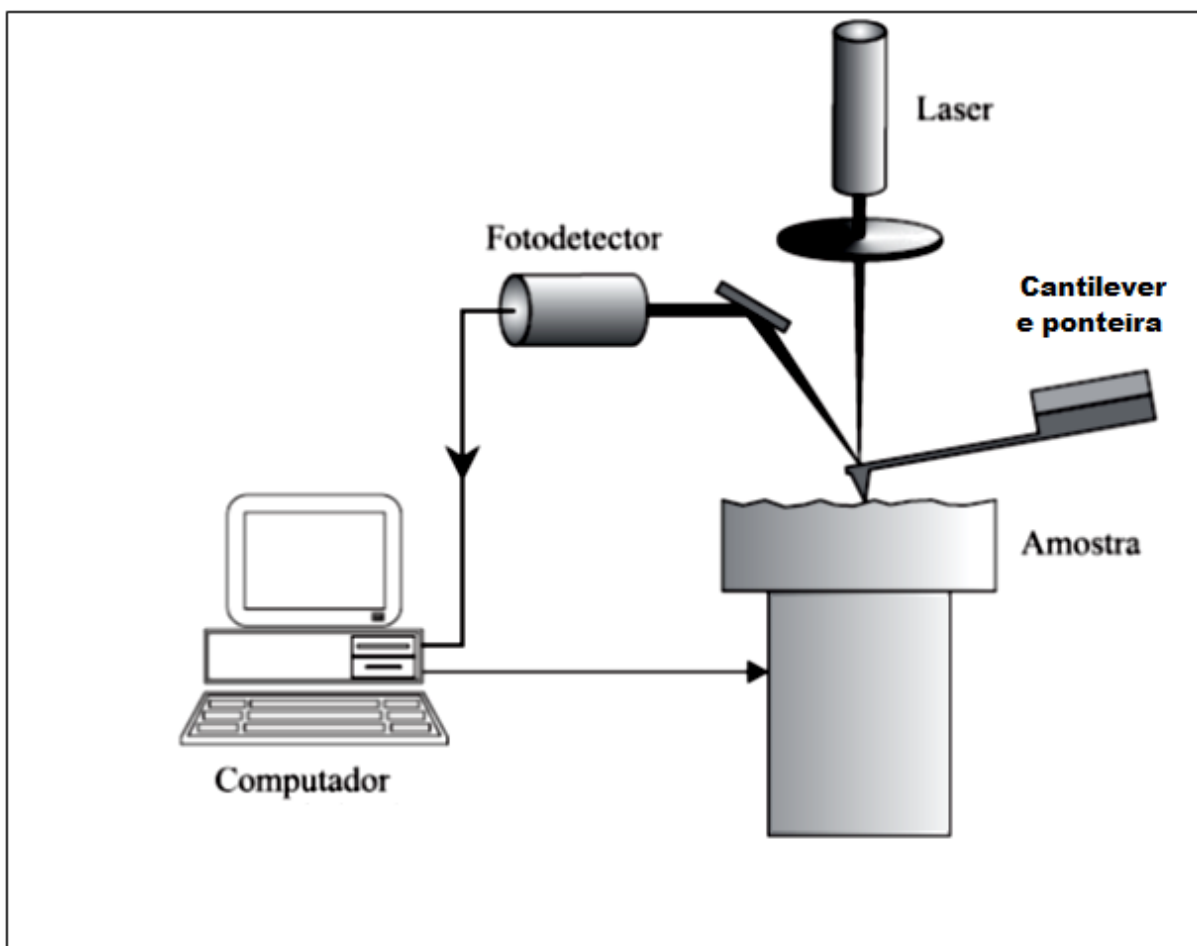
No ano de 1981, Binning e Rohrer criaram uma técnica conhecida como microscopia de tunelamento (“Scanning Tunneling Microscopy – STM”), que representou uma solução para a obtenção de imagens de superfície diversas, como metálicas (FERREIRA; YAMANAKA, 2006). Eles propuseram a medição de forças “ultrapequenas” sobre partículas diminutas como um átomo, através do monitoramento da deformação ou deslocamento elástico de molas (BINNIG; QUATE, 1986). Todavia, esta técnica mostrou-se ineficiente no âmbito de limitar a possibilidade das análises, pois apenas superfícies de amostras que apresentavam condutância de elétrons – basicamente materiais metálicos – poderiam ser avaliadas (FERREIRA; YAMANAKA, 2006).

Em 1986, baseando-se nos mesmos fundamentos da STM, os pesquisadores Binnig e Quate criaram o microscópio de força atômica (“Atomic Force Microscopy” – AFM). Técnica mais ampla e vantajosa em relação a STM, pois possibilitou a formação de imagens de superfícies não condutoras, sendo capaz de medir qualquer tipo de força, inclusive as de van der Waals (Interatômicas e intermoleculares) em escala atômica. Aumentando assim a abrangência e as possibilidades de utilização deste equipamento no âmbito da pesquisa, principalmente em estudos biológicos (BINNIG; QUATE, 1986).

O mecanismo de funcionamento deste equipamento baseia-se na varredura da superfície da amostra por meio de uma ponta piramidal (ponteira ou ponta de prova), de aproximadamente 100µm, que é integrada a um “cantilever” flexível. Estas duas estruturas formam a sonda, componente fundamental para alcançar a resolução desejada na formação de imagens. A porção final da ponta é constituída por um conjunto de átomos, responsáveis por exercer uma força entre a ponta e a superfície da amostra, o que desencadeia a aproximação ou o afastamento do cantilever da

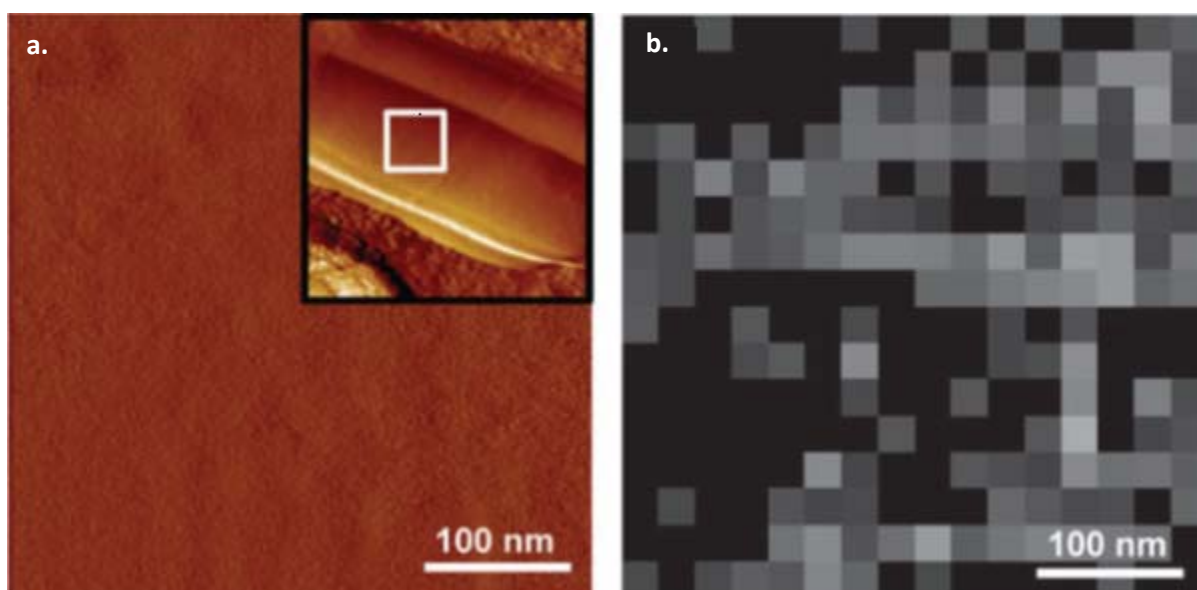
superfície, gerando assim as curvas de força. Estas curvas de força geradas são proporcionais à força de interação entre a ponta e a amostra (FERREIRA; YAMANAKA, 2006).

Na porção superior do equipamento encontra-se um espelho. Este reflete a luz derivada de um feixe de laser que foi incidida sobre a amostra. Após esta reflexão da luz, o feixe passa por uma lente que incide sobre um fotodetector. Este fotodetector capta as variações e a intensidade da luz produzida pelas deflexões do “cantilever”. As referidas variações das deflexões captadas são processadas e armazenadas por um software que gera imagens tridimensionais em alta definição (Figura 5).



**Figura 5** : Representação esquemática do funcionamento do microscópio de força atômica (AFM).  
[Adaptada de Herrmann et al. (1997)]

Além de gerar imagens tridimensionais, ou topografias, de superfícies (em escalas minimamente pequenas), o equipamento também pode processar imagens denominadas força-volume (force-volume imaging- FVI) ou diagramas de força-volume (**Figura 6**). Trata-se de imagens geradas a partir da gravação de diversas curvas de força, sobre um diagrama espacial, no qual cada pixel formado representa um padrão físico na distribuição espacial da amostra (POLYAKOV et al., 2011). A análise das FVI proporciona um mapeamento fino destes padrões e, através disto, podem-se aferir propriedades importantes para sistemas biológicos heterogêneos (tecidos, células) como rigidez, aderência ou adesão celular na superfície e homogeneidade (WEBB et al., 2011).



**Figura 6:** Exemplos de imagens formadas pelo Microscópio de Força Atômica (AFM). **a.** Imagem tipo topográficas; **b.** Imagem da força de adesão. [ Retirada de Verbelen e Dufrêne (2009)]

A utilização do AFM em pesquisas biológicas tem crescido nos últimos anos, já que este equipamento possibilita avaliar parâmetros até então pouco mensurados nas pesquisas, como força de adesão, forças de atração e repulsão entre células, moléculas e/ou superfícies (WEBB et al., 2011). Algumas pesquisas em que esta técnica tem sido aplicada, por exemplo, é na obtenção de imagens da morfologia

viral do *Tabaco Mosaic vírus* e de outros vírus em planta, em sua forma cristalina (KUZNETSOV et al., 2011). Já em vírus que infectam humanos, tem sido empregada na avaliação da superfície celular dos vírus *Moloney murine* e HIV (KUZNETSOV et al., 2004; KUZNETSOV et al., 2003). Além disso, cientistas já investigaram os mecanismos responsáveis pela iniciação da transcrição em *E. coli* através da formação de imagens das interações de DNA e RNA polimerase em tempo real (RIPPE et al., 1997; KASAS et al. 1997). No estudo de proteínas, a AFM tem sido utilizada para visualizar interações interproteicas, como entre a  $\beta$ -amilase e a lisozima (MC ALLISTER et al., 2005). Todavia, a utilização desta técnica para análise de células e estruturas vegetais ainda é pouco reportada.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Investigar a existência de interferência dos vírus *Papaya ringspot virus*- type p e *Papaya meleira virus* no desenvolvimento de sementes oriundas de mamoeiros infectados.

### 2.2. Objetivos Específicos:

- Analisar embriões de sementes formadas em plantas infectadas por meio de microscopia de força atômica;
- Aferir a qualidade fisiológica das sementes por intermédio da pesagem, teste de viabilidade e testes de germinação;
- Verificar o crescimento da planta por meio de medições do caule e das raízes;
- Avaliar a biomassa por meio da pesagem da massa fresca e massa seca.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Delineamento Experimental**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Aplicada ao Agronegócio (LBAA), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado. Pretendeu-se avaliar comparativamente a germinação e o crescimento inicial das sementes de três tratamentos, a saber: (1) sementes oriundas de plantas saudáveis; (2) sementes oriundas de plantas infectadas pelo *Papaya ringspot virus*- P (PRSV-P) e (3) sementes oriundas de plantas infectadas com *Papaya meleira virus* (PMeV). Para tal finalidade, o delineamento experimental foi dividido em três etapas: Teste de germinação, teste de sobrevivência e análise do crescimento.

No teste de germinação utilizou-se quatro lotes de 50 sementes para cada tratamento; sendo, então, três tratamentos com quatro repetições (n=50). A partir das sementes germinadas, o teste de sobrevivência de plântulas foi realizado com 50 sementes germinadas para cada tratamento. A utilização deste número de sementes foi implementada com vistas a propiciar uma margem de segurança ao experimento da análise de crescimento. Esta foi realizada com o total de 20 plantas para cada tratamento, sendo cinco plantas para quatro repetições.

#### **3.2. Obtenção dos frutos e folhas**

Os frutos da variedade Golden foram coletados entre os estágios 2 e 3 de maturação – segundo classificação da EMBRAPA (2000) – oriundos de plantas saudáveis e infectadas. Os mamoeiros doentes foram detectados pelos sintomas visuais em folhas e frutos, característicos de cada doença, conforme descrição na literatura (MANICA et al., 2006). Amostras de folhas também foram coletadas das respectivas plantas e, estocadas em ultrafreezer para realização das detecções moleculares.

### 3.3. Diagnóstico molecular

As amostras de folhas foram pulverizadas em nitrogênio líquido e estocadas em tubos “Falcon” no ultrafreezer até a etapa da extração. Para a extração de ácidos nucleicos utilizou-se CTAB 2% (DOYLE; DOYLE, 1987). A dosagem foi realizada em espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer*. As amostras, na sequência, foram tratadas com DNase I (PROMEGA), conforme especificações do fabricante. Para realizar a síntese do DNA complementar (cDNA) utilizou-se o kit M-MLV Reverse Transcriptase (INVITROGEN), segundo o protocolo disponibilizado pelo fabricante para a referida enzima. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional foi feita com iniciadores específicos para os dois vírus estudados e Taq polimerase (INVITROGEN).

Os Iniciadores específicos para amplificar os fragmentos (amplicons) do gene do capsídeo viral do PRSV-P foram desenhados a partir da sequência AF344644 (Gen Bank) – isolado de Linhares (ES). O software utilizado para este fim foi o Primer 3 Plus (versão 0.4). O amplicon gerado, por sua vez, foi de 207 pares de bases.

Iniciador (PRSV-P) Senso	TGC TAG TGA CGG AAA CGA TG
Iniciador (PRSV-P) Antisenso	ATT GTG ATT GAG TGG CAC GA

**Tabela 1:** Sequência dos iniciadores desenhados para gene cp (AF344642.1/Gen Bank) do vírus PRSV-P .

Com relação aos iniciadores para detecção molecular do vírus PMeV, pela amplificação de fragmentos do seu genoma, foram descritos por Abreu et al. (2012).

Posterior à reação de PCR, os amplicons (produtos da PCR) foram corridos no gel de agarose, em uma cuba de eletroforese, durante 1 hora e 10 minutos, a uma voltagem de 70V.

### **3.4. Coleta e processamento das sementes de *C. papaya* – pré-experimento de germinação**

Os frutos foram abertos e as sementes coletadas com o auxílio de uma faca e uma espátula. As sementes de cada tratamento foram colocadas, separadamente, em béqueres contendo água destilada durante trinta minutos, com o objetivo de facilitar a retirada da sarcotesta. Após este período, as sementes foram submetidas à fricção em peneiras plásticas e em água corrente até a total eliminação da sarcotesta. Posteriormente, as sementes foram postas em placas de petri para secagem em temperatura controlada (20°C) e armazenadas em sacos de papel devidamente identificados, segundo Althoff e Carmona (1999).

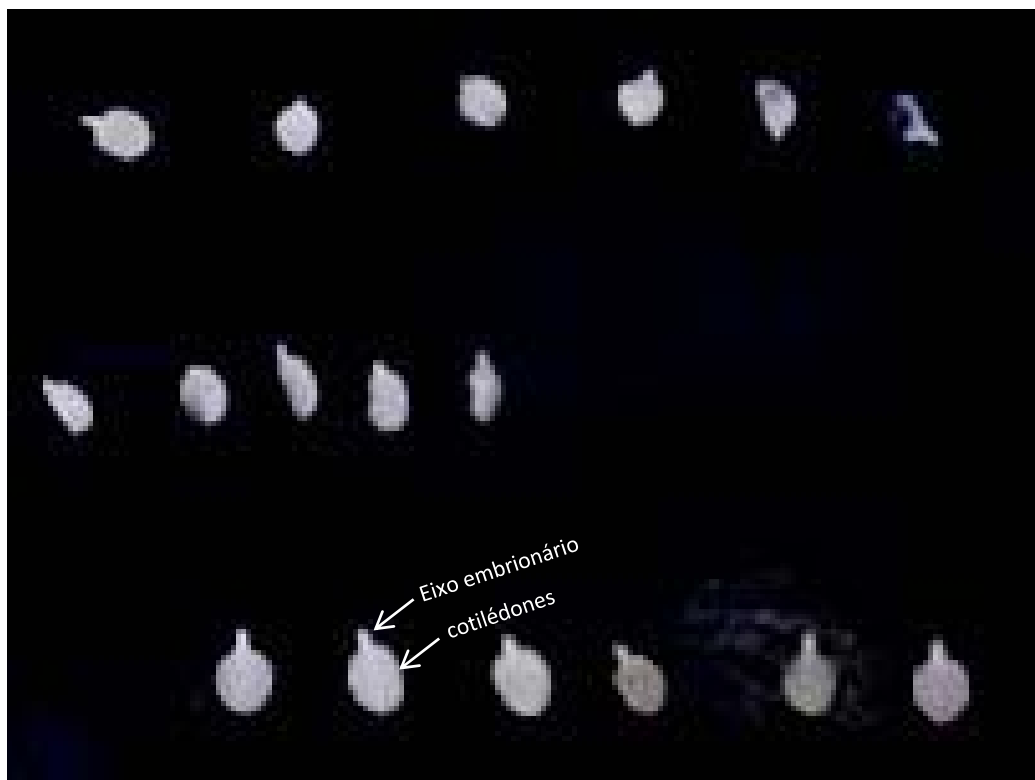
### **3.5. Teste de viabilidade das sementes de *C. papaya* utilizando o reagente Cloreto de tetrazólio**

A fim de verificar a viabilidade dos lotes de sementes que foram utilizados no experimento, realizou-se o Teste Tetrazólio (SOUSA et al., 2010) a partir de uma solução com Trifenil cloreto de tetrazólio (sal de Tetrazólio) a 1%. Para isto, as sementes de cada tratamento foram seccionadas longitudinalmente em relação ao eixo embrionário. O controle utilizado neste experimento foram sementes mortas com água fervente, com o intuito de contrastar a não-coloração dos tecidos mortos em relação aos tecidos vivos das amostras. Após a secção das sementes dos grupos amostrais e do grupo controle, as mesmas foram colocadas separadamente em uma placa de petri, mergulhadas na solução descrita acima, protegidas da luminosidade e levadas a um banho-maria pré-aquecido à 35°C durante 3 horas – segundo a metodologia descrita por Althoff e Carmona (1999). Passado este período, as sementes foram retiradas da solução, agrupadas e fotografadas para a análise. Sendo que, para cada tratamento (S, PRSV-P e PMeV) utilizou-se 50 sementes para a realização do teste.

### 3.6. Preparação dos embriões de *C. papaya* para análise por microscopia de força atômica

Com o intuito de analisar os embriões de *C. papaya* por meio da microscopia de força atômica (“Atomic Force Microscopy” – AFM), selecionou-se 9 sementes (n=9) em cada tratamento. Estas foram divididas para serem analisadas em três tempos distintos de germinação – dia 0 (semente seca), 2 dias pós-semeadura e 4 dias pós-semeadura – ou seja, utilizou-se o total de 3 repetições (sementes/embriões) para cada tempo. Assim sendo, as sementes de análises pós-semeadura foram submetidas a todas as etapas para a germinação (ver tópico 3.7); sendo um grupo analisado 2 dias após a semeadura e o outro 4 dias após a semeadura [segundo Liu et al., (2013)]. Considerou-se que o último tempo de análise (4 dias pós-semeadura) corresponde a aproximadamente metade do tempo para o início da germinação em sementes do tratamento controle (Sadio).

Tais sementes – em cada tempo de análise – foram dessecadas para a retirada dos embriões, com o auxílio de uma pinça, agulha descartável e bisturi (**Figura 7**). Assim sendo, testa foi retirada cuidadosamente – iniciando pelo sentido contrário à micrópila – com o objetivo de preservar a integridade do embrião. O endosperma, então, foi separado e o embrião retirado e colocado em placa de petri com água destilada e, na sequência levado(s) para análise.



**Figura 7:** Imagem ilustrativa de embriões de *C. papaya*.

A análise dos embriões foi realizada por meio de um equipamento de microscopia de força atômica (AFM), modelo SPM-9600 series (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). As pontas de prova e "cantilevers", utilizados foram de Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>, modelo OMCL-TR (Olympus, Tokyo, Japan), com constante de força de 0,57 N/m e frequência de ressonância de  $\approx 73$  kHz. Os embriões foram fixados em uma lamínula de metal, com o auxílio de uma fita adesiva dupla face de 1cm<sup>2</sup>. Após a fixação das amostras, três pontos de leitura foram aleatoriamente escolhidos para análise. Os diagramas de força-volume (FVI) foram gerados pelo modo contato com força constante, a área máxima de varredura foi 16x16 (totalizando 256 pontos de medição) e a área total de 1,0  $\mu\text{m}^2$ . As imagens, ou diagramas, foram obtidos a partir da interação entre as pontas de prova e a superfície da amostra, utilizando-se dos dados das curvas de força. A análise foi realizada pelo software "Force Mapping". Os dados obtidos foram interpretados e as imagens com valores que representaram a média da força máxima obtida foram selecionadas.

### 3.7. Teste de germinação

Previamente ao teste de germinação, todos os instrumentos e vidrarias a serem utilizados foram autoclavados. Os 12 lotes de 50 sementes (3 tratamentos e 4 repetições) foram separados e pesados em balança de precisão. Em seguida, foram submetidos à sanitização em condições de assepsia: um minuto em álcool 70%, 5 minutos em Hipoclorito de Sódio 2,5% e lavados três vezes com água destilada autoclavada (ADA). Na sequência, as sementes foram mergulhadas em ADA, onde permaneceram durante uma hora e meia.

O procedimento posterior trata da preparação das placas de petri para a germinação e ocorreu da seguinte forma: quatro camadas de gaze foram colocadas sobre cada placa de petri estéril de 146x21mm – sendo que cada placa representou uma repetição experimental para os dados tratamentos. As referidas camadas foram embebidas com ADA até o seu ponto máximo de saturação. Após o período de hidratação das sementes, estas foram distribuídas uniformemente sobre a gaze úmida, as placas foram, por sua vez, fechadas e colocadas para germinar. As condições para germinação na câmara incubadora B.O.D. foram com fotoperíodo de 8 horas claro/ 16 horas escuro e temperaturas 30°C/ claro e 20°C/ escuro (MAPA, 2009).

O método para avaliar a progressão da germinação, para os dados tratamentos, baseou-se na realização da contagem diária das sementes germinadas durante o período de 30 dias pós-semeadura. Sendo que uma semente foi considerada como germinada a partir da emissão da radícula (MAPA, 2009).



**Figura 8:** Parte do teste germinação de sementes de *C. papaya*. Realizado em placas de petri.

### **3.8. Transferência das sementes germinadas para casa de vegetação**

Após o processo de contagem e análise da germinação, iniciou-se a transferência das sementes germinadas para a casa de vegetação com vistas à implementação do experimento de análise do desenvolvimento das plantas. Um total de 50 sementes germinadas para cada tratamento foi transferido. O substrato foi preparado na proporção 3:1 de substrato Forth por areia lavada. Esta mistura foi colocada em sacos de polietileno preto, propícios para a produção de mudas, com dimensões de 20 x 30 centímetros, nos quais as sementes germinadas foram plantadas, devidamente identificadas e agrupadas em casa de vegetação (**Figura 9**). Mantidas sob condições de umidade controlada, com intervalo de irrigação de 12 horas.





**Figura 9:** Parte do experimento realizado em casa de vegetação.

### 3.8.1. Avaliação do desenvolvimento das plântulas

Com o intuito de avaliar o crescimento caulinar, foram realizadas a cada 10 dias, medições da parte aérea em todas as plantas ( $n= 50$  por tratamento) – com o auxílio de um paquímetro manual. Avaliou-se, também, a sobrevivência por meio da contagem das plantas mortas a cada medição. Após o período de trinta dias da transferência para casa de vegetação, foram escolhidas aleatoriamente 20 plantas para cada tratamento – sendo quatro repetições com cinco plantas (4x5) –, para realizar as medições pelo método destrutivo, ou seja, retirada da planta do substrato. As plantas foram retiradas cuidadosamente do substrato, procedendo-se à lavagem das raízes. Em seguida as plantas foram levadas rapidamente ao laboratório, onde foram submetidas à pesagem em balança analítica para avaliação da massa fresca. Após a pesagem, as raízes foram medidas, com o auxílio de um paquímetro manual (**Figura 10**). Na sequência, as plantas foram colocadas sobre uma placa de petri e levadas a uma estufa de secagem à 30°C, durante 24 horas. Após este período, as plantas dessecadas foram pesadas novamente em balança analítica para avaliação da massa seca.



**Figura 10:** Medições das plantas.

### 3.9. Tratamento estatístico

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e à análise de variância pelo teste Tukey ( $p < 0,05$ ), realizados no software Assistat (versão 7.7 beta). Os gráficos foram feitos no software Graphpad Prism (versão 6.0).

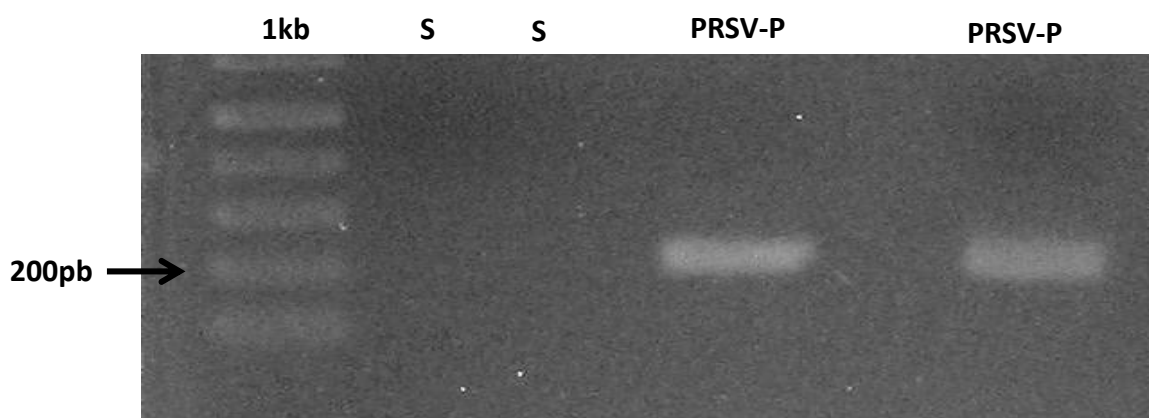
Após o término da contagem das sementes germinadas, calculou-se o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) por meio da fórmula de Maguire (1962):  $IVG = G1/N1 + G2/N2 + \dots + Gn/Nn$  onde:  $G1, G2, Gn$  = número de plântulas germinadas na primeira, segunda, até a última contagem e  $N1, N2, Nn$  = número de dias desde o primeiro, segundo, até a última contagem. Este índice sinaliza que quanto maior o valor encontrado, menos vigorosa é a semente, uma vez que esta necessitou de mais tempo para germinar. O tempo médio de germinação também foi calculado, este representa o tempo em que ocorre 50% da germinação total. A fórmula é representada por  $t_m = \sum n_i t_i / \sum n_i$ , onde  $t_i$  é o tempo entre o início do experimento e a  $i$ -ésima observação (dia) e  $n_i$  é o número de sementes germinadas no tempo  $t_i$  (SANTANA; RANAL, 2004). Já para a curva de germinação, o modelo utilizado foi o sigmoidal [ $f(x) = A / [1 + b \cdot \exp(-cx)]$ ], onde  $f(x)$  é a porcentagem acumulada da germinação;  $x$  é o tempo de germinação;  $b$  e  $c$  são coeficientes e  $\exp$  é a base do logaritmo. Tal modelo expressa melhor a assincronia do processo germinativo do mamoeiro (SANTANA; RANAL, 2004). Além de demonstrar a porcentagem da germinação acumulada ao longo do tempo, ou seja, a soma gradual das porcentagens de germinações diárias até atingir a porcentagem máxima.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Diagnóstico Molecular

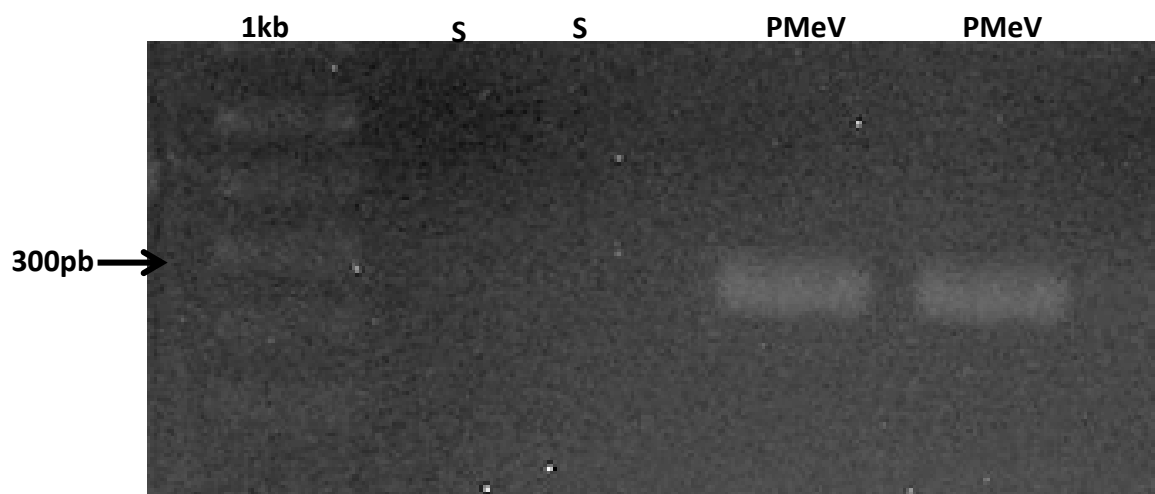
Os diagnósticos moleculares dos mamoeiros infectados apresentaram resultado positivo para ambos os vírus (PRSV-P e PMeV), visto que ocorreu a amplificação dos fragmentos de tamanhos específicos. Para o grupo controle (sadio), o resultado foi negativo para a presença dos vírus.

O fragmento amplificado do genoma do vírus PRSV-P, foi de 207 pares de bases (**Figura 11**). A referida detecção corrobora com a descrição dos iniciadores, quanto a locais de anelamento e dimensões do fragmento obtido – conforme exposto no tópico 3.3 dos Materiais e Métodos.



**Figura 11:** Diagnóstico molecular para o vírus PRSV-P.

Quanto ao diagnóstico molecular do vírus PMeV, ocorreu a amplificação de um fragmento entre 200 e 300 pares de base (**Figura 12**), em conformidade descrição de Abreu et al. (2012).



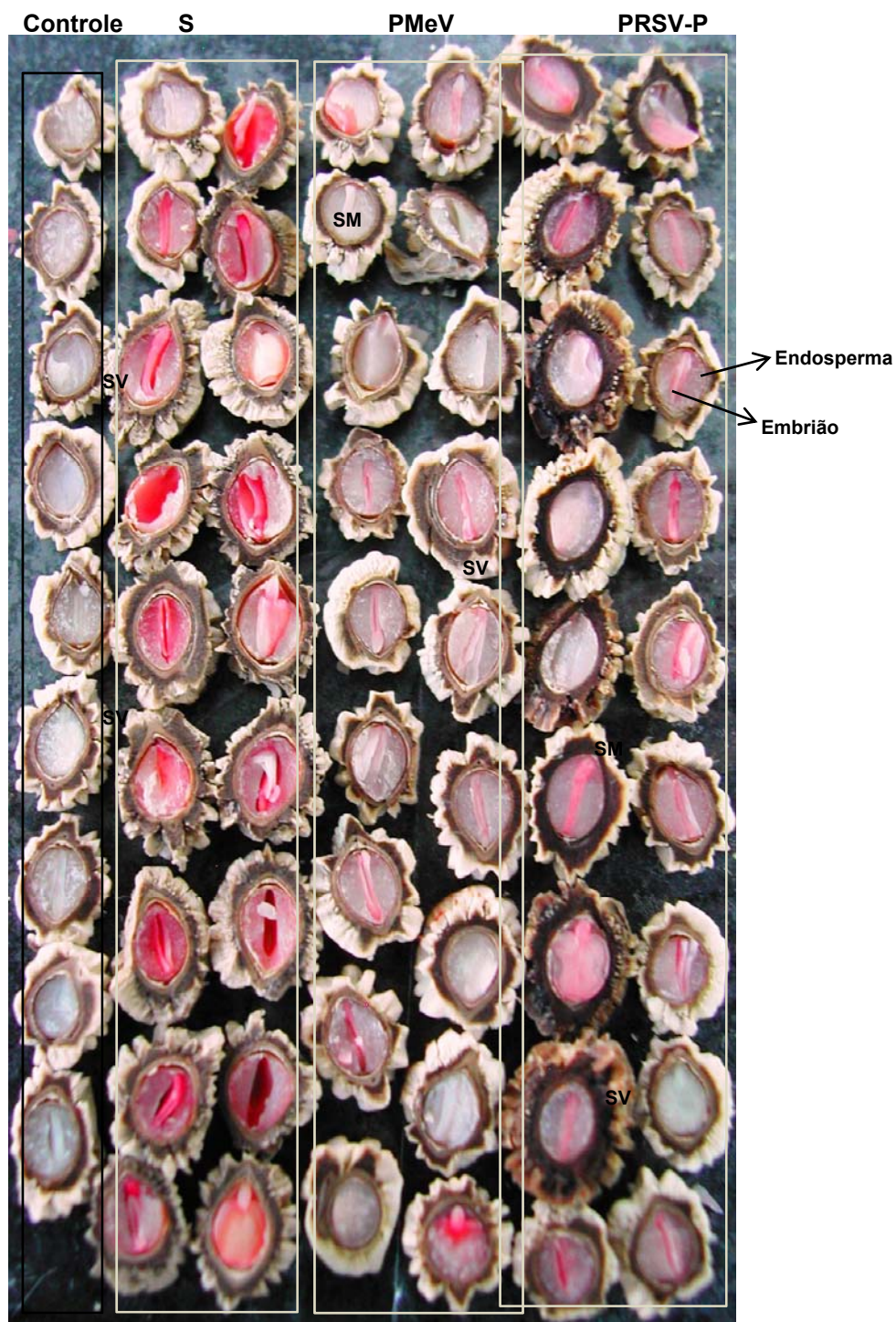
**Figura 12:** Diagnóstico molecular para o vírus PMeV

## 4.2. Teste de viabilidade

Realizou-se o Teste Tetrazólio com o intuito de avaliar a viabilidade das sementes a serem germinadas (**Figura 13**). Assim sendo, após o término do teste, a interpretação deu-se da seguinte forma: sementes coradas de vermelho carmim, ou rosa, representam sementes vivas (viáveis) e as não-coradas, ou brancas, são consideradas sementes mortas ou não viáveis (GASPAR-OLIVEIRA et al., 2010). Para o controle do teste – conforme descrito no tópico 3.5 – as sementes mortas mantiveram a coloração inicial (branca), tendo em vista que não houve reação com o sal de tetrazólio.

Após a interpretação dos dados, obteve-se para tratamento S 90% de sementes viáveis (n=45). No tratamento PRSV-P, 82% das sementes (n=41) apresentaram viabilidade, já no tratamento PMeV apenas 58% das sementes (n=29 ) obtiveram tal resultado. Assim, pode-se observar que, para o tratamento PMeV, a viabilidade de um grande número de sementes foi comprometida.





**Figura 13:** Parte do teste tetrazólio realizado em semente de mamão. **sm**: semente morta; **sv**: semente viável.

### 4.3. Microscopia de Força Atômica nos embriões de *C. papaya*

Os diagrama de força-volume foram obtidos a partir da superfície dos embriões de *C. papaya*, advindos dos três tratamentos (S, PRSV-P e PMeV) – durante os distintos tempos de análise (0, 2 e 4 dias pós-semeadura). Os referidos diagramas são apresentados na forma de imagens sendo, através destas, possível verificar a distribuição espacial das forças de adesão e a uniformidade da superfície de uma amostra. Tais informações são visualizadas pela disposição das curvas de força representadas por cada “pixel” que forma a imagem (**Figura 14**). A referida imagem é composta no total por 256 medições (“pixel”) que apresentam graduações de tonalidades (em escala de cinza), sendo que cada tonalidade representa um valor de força detectado. Através disto é possível verificar a homogeneidade da amostra, tendo em vista que quanto menor a variação de tonalidade sobre o diagrama maior será a homogeneidade da superfície da amostra (VERBELEN; DUFRÊNE, 2009). As informações fornecidas pelo diagrama são complementadas através de um histograma localizado na lateral das imagens (**Figura 14**). Este apresenta a graduação de tonalidades, ou valores de força, e a frequência em que determinada força foi aplicada sobre a amostra.

Com base nestes fundamentos, no que tange à análise dos embriões correspondentes ao tempo 0 de germinação (semente seca), todos os tratamentos (S, PRSV-P e PMeV) apresentaram baixa homogeneidade referente à força de adesão, sendo que no tratamento PMeV esta homogeneidade foi ainda mais reduzida. O referido dado (homogeneidade) pode ser observado por meio da distribuição da frequência de força nos gráficos (**Figura 14**), ou seja, os picos de frequência apresentam distribuição contínua ao longo do gráfico (valores distintos de força). Esta distribuição dos picos foi ainda mais espaçada para o tratamento PMeV (**Figura 14**). O tratamento S, apresentou valor máximo de força de 1.887nM. Para o tratamento PRSV-P, por sua vez, o valor máximo de força foi 1.813nN, próximo ao valor de S. O tratamento PMeV, além de apresentar a menor homogeneidade, obteve um reduzido valor de força máxima, 0,041.

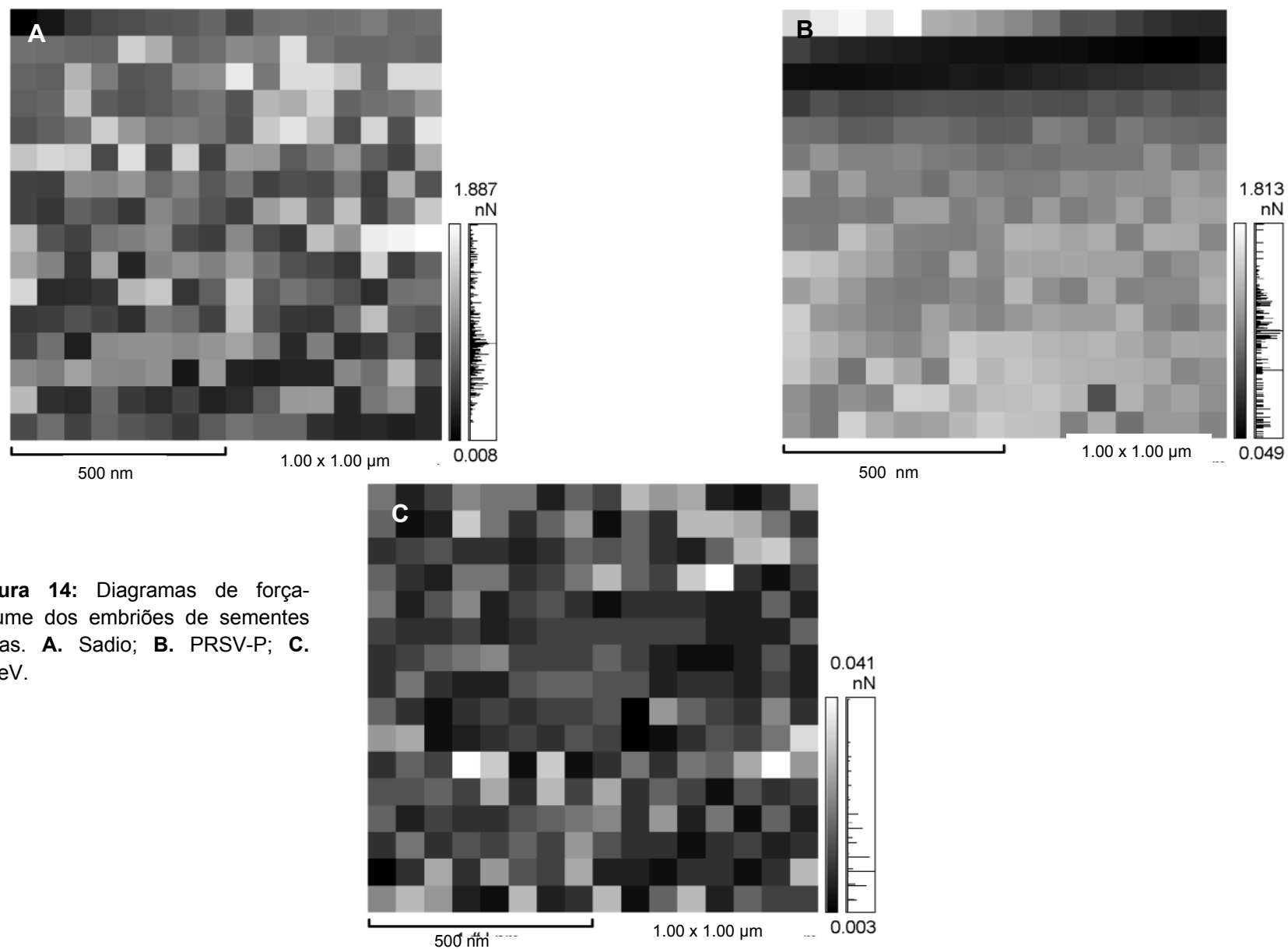
Fisiologicamente, estes dados podem ser justificados ao considerar que no estado embrionário, as sementes secas (em dormência) – ortodoxas e intermediárias – apresentam inúmeras alterações adaptativas para aumentar sua tolerância abiótica



aos períodos de estocagem. Tais adaptações visam proteger a membrana e os conteúdos celulares dos danos ocasionados pela dessecação. Com este intuito, à medida que a semente amadurece, sofre uma gradativa perda de água e, consequentemente, inicia-se o acúmulo de açúcares e proteínas nas células embrionárias (TAIZ; ZEIGER, 2013). Este mecanismo de acúmulo é muito importante para reduzir o metabolismo celular, aumentar a tolerância à dessecação e evitar ocorrência da plasmólise celular (WOODENBERG et al., 2015). No entanto, esta perda de água é responsável pela redução da turgidez dentro da célula e, consequentemente, pela alteração conformacional da mesma. Com isto, as células tomam-se mais ovalada e compactas, fazendo com que os tecidos embrionários ocupem menor volume dentro do endosperma (WOODENBERG et al., 2015). Woodenberg et al. (2015) também relatam que, nesta etapa, em função desta “compactação celular”, ocorre a formação de dobras na parede celular.

As alterações fisiológicas ocorridas após a maturação do embrião, podem ser a causa para a reduzida força de adesão e homogeneidade dos tecidos, verificadas em todos os tratamentos na análise do tempo 0 dias – sendo ainda menor no tratamento PMeV, isto quando se compara tais parâmetros (força de adesão e homogeneidade) relacionados ao referido tempo (0 dias) com os dos demais tempos (2 e 4 dias) –**Figuras 15 e 16**. Baseando-se no que foi exposto, discute-se que nos embriões da semente seca (0 dias) a parede celular, possivelmente, reduziu a sua elasticidade e rigidez em função da perda de turgidez e do volume celular.

Como dito anteriormente, a força de adesão e a homogeneidade no tratamento PMeV (0 dias) foram inferiores aos demais tratamentos. Pondera-se que, possivelmente, a presença do vírus PMeV pode causar deformações estruturais na parede celular do embrião e, com isso, afetar algumas propriedades como: aumento da perda de água (redução da turgidez) e redução do volume celular, além de causar a redução da resistência da parede celular.

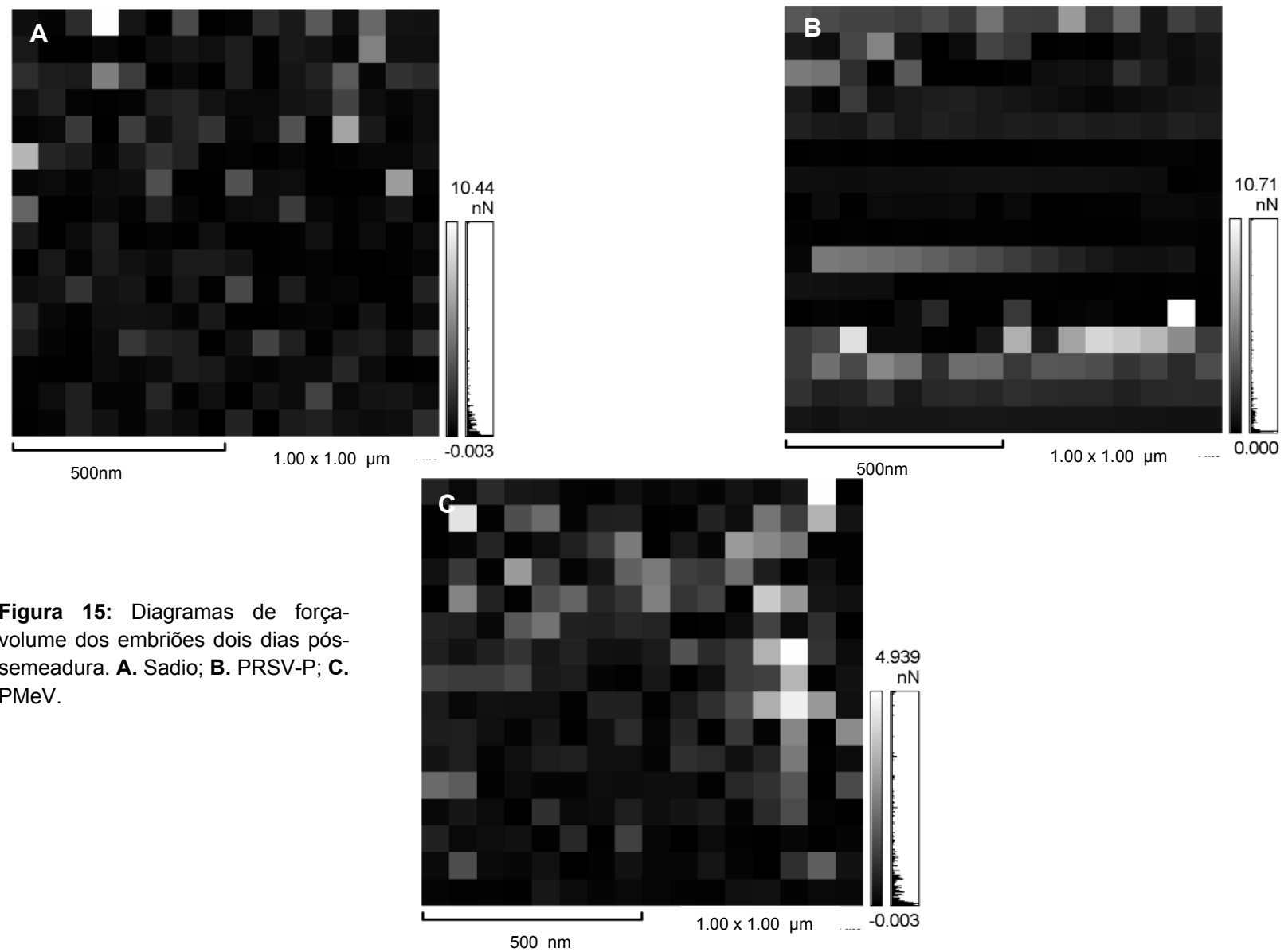


**Figura 14:** Diagramas de força-volume dos embriões de sementes secas. **A.** Sadio; **B.** PRSV-P; **C.** PMeV.

No que tange ao segundo tempo de análise (02 dias de germinação), de forma geral, todos os tratamentos apresentaram um aumento no valor máximo da força de adesão e na homogeneidade da superfície dos embriões. Todavia, para o tratamento PMeV estes parâmetros mantiveram-se inferiores aos demais. Quanto à distribuição das frequências de força de adesão para os tratamentos S e PRSV-P, estas ficaram concentradas abaixo de 5nN, revelando que a homogeneidade da superfície dos embriões, em ambos os tratamentos, aumentou em relação à análise anterior (0 dias). Destaca-se que, novamente, os dados dos tratamentos S e PRSV-P foram muito semelhantes, pois o valor máximo de força foi 10,44nN para o tratamento S, enquanto o tratamento PRSV-P, obteve o valor máximo de força em 10,71nN (**Figura 15**). No tratamento PMeV, por sua vez, obteve-se o valor máximo de força em 4,9nN, e a distribuição das frequências de força encontra-se menos concentrada e abaixo de 2nN, valor inferior aos demais tratamentos. A partir desta menor concentração e, por meio do padrão de distribuição das tonalidades no diagrama, denota-se que este tratamento apresentou força de adesão e homogeneidade inferiores aos demais (**Figura 15**).

Pode-se compreender melhor o aumento nos valores de força de adesão para todos os tratamentos, em relação à primeira análise (0 dias), a partir do entendimento das alterações fisiológicas sofridas pela semente durante o processo de embebição; sendo que este ocorre neste período (02 dias pós-semeadura). O estágio inicial da embebição, ou absorção de água pela semente seca, é uma etapa muito importante para a germinação, pois representa o primeiro evento da quebra do estado de dormência para a retomada do crescimento e diferenciação das células embrionárias. A capacidade de absorção de água pela célula está diretamente associada às propriedades das paredes celulares e membranas. Assim, as membranas atraem moléculas de água através da diferença do potencial osmótico e, quanto maior for a concentração de compostos solúveis presentes na célula, maior será a atração das moléculas. Todavia, conforme o aumento da entrada das moléculas de água na célula vegetal ocorre, uma força incidida sobre a parede celular, denominada pressão de turgescência, também cresce. À medida que a referida pressão é ampliada, como resultado da força de retenção nas células da parede, estas tendem a retardar a absorção de água (MCDONALD, 2014). Através do exposto, reflete-se que o aumento da pressão de turgescência pode ter

representado o evento responsável pelo aumento da força de adesão e da rigidez, verificadas na superfície dos embriões, em todos os tratamentos.



**Figura 15:** Diagramas de força-volume dos embriões dois dias pós-semeadura. **A.** Sadio; **B.** PRSV-P; **C.** PMeV.

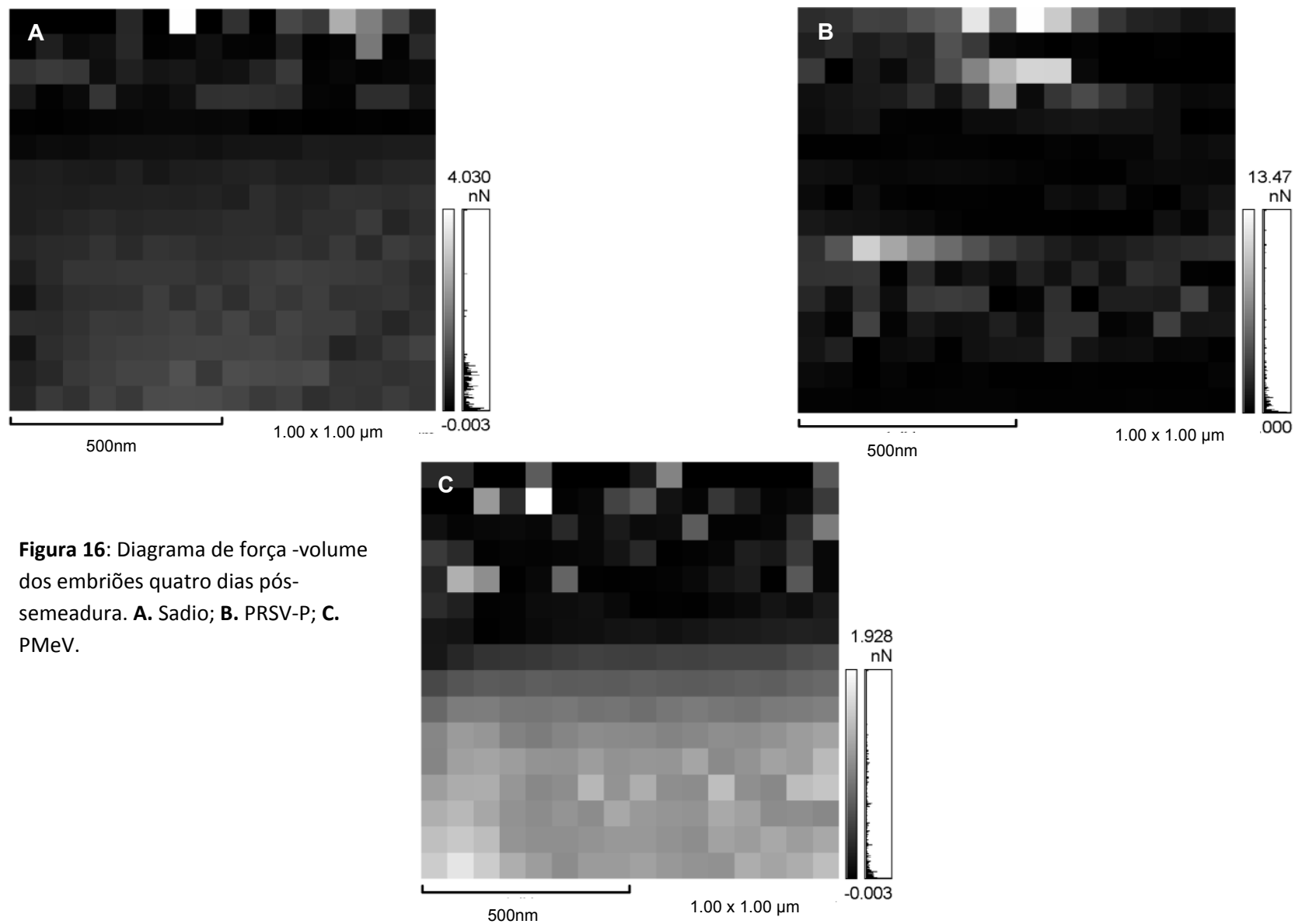
No que se refere à última análise de embriões, realizada no tempo 04 dias pós-semeadura, constatou-se uma grande redução no valor máximo de força de adesão para o tratamento S, em relação à última análise (de 10,44nN para 4,0nN). Quanto à distribuição da frequência de força para este tratamento, observou-se que os maiores picos estão concentrados aproximadamente abaixo de 2nN, revelando a homogeneidade dos tecidos. No tratamento PRSV-P, ao contrário, observa-se um aumento no valor máximo de força (de 10,71 para 13,4), sendo que a distribuição da frequência concentrou-se abaixo de 7nN, evidenciando também a homogeneidade do tecido.

O tratamento PMeV, por sua vez, reduziu o valor máximo de força (de 4,9nN para 1,9nN), todavia, a distribuição das frequências de força não foram concentradas, o que demonstra a baixa homogeneidade a amostra. Ademais, considerando a distribuição da frequência de força entre o tempo 02 dias e o tempo 04 dias (**Figura 16**), para o tratamento PMeV, constata-se que não houve diferença entre os valores de força encontrados nas duas análises, uma vez que, no tempo 02 dias (**Figura 15**), os picos estão concentrados abaixo de 2nN (homogeneidade). Já no tempo 04 dias, os picos estão distribuídos na extensão do gráfico com valor máximo 1,9nN (baixa homogeneidade), demonstrando que os valores de força não obtiveram uma redução considerável entre as duas análises.

Por meio da interpretação dos dados dos três tratamentos, verifica-se que apenas o tratamento S apresentou decréscimo na força de adesão para a análise do tempo 04 dias. Possivelmente, o referido tratamento apresentou tal condição em função da retomada do crescimento, após a fase de turgidez, que desencadeou na multiplicação e alongamento celular, etapas fundamentais para o processo de diferenciação. Segundo Labavitch (1981), durante esta fase, a parede celular sofre um enfraquecimento estrutural transitório para que possa aumentar o seu volume (alongamento celular) para assim o desenvolvimento ocorrer. Segundo este autor, tanto a síntese quanto a degradação (hidrólise), da parede celular tornam-se ações integradas nesta etapa. É relatado também que a redução da resistência à tração na parede celular é responsável por um aumento transitório na taxa de crescimento (WADA et al., 1968).

Discute-se que a redução nas frequências de força de adesão e na rigidez da superfície embrionária, observados no tratamento S (**Figura 16**), podem estar

associadas à perda da tração, devido a degradação da parede celular, nesta etapa do desenvolvimento embrionário. Entende-se, a partir da interpretação dos dados que, possivelmente, os embriões dos demais tratamentos (PRSV-P e PMeV) ainda não entraram na referida etapa – multiplicação e diferenciação celular – revelando assim um retardo no desenvolvimento dos mesmos. Acredita-se que estes ainda encontram-se na fase de embebição, relatada anteriormente, onde a força de adesão e a rigidez encontradas apresentam valores superiores. No que tange ao retardo no desenvolvimento, o mesmo também foi confirmado através do cálculo do tempo médio de germinação (ver Tabela 2), que, para ambos os tratamentos (PRSV-P e PMeV), foram superiores em relação ao tratamento controle (S). Todavia, para o tratamento PMeV, o referido valor foi muito superior (17 dias) ao do tratamento PRSV-P (13 dias) que, mesmo apresentando um retardo obteve valores muito próximos ao do grupo S (11 dias). Em função disto, acredita-se que o dado retardo em PRSV-P, verificado na análise dos embriões, trata-se deste atraso de dois dias no tempo médio de germinação. Possivelmente, as células embrionárias do tratamento PRSV-P, neste tempo de análise (04 dias), aumentaram e mantiveram a turgidez celular, todavia, nos dias posteriores, acredita-se que estas células apresentam um rápido desenvolvimento e alongamento celular.



**Figura 16:** Diagrama de força -volume dos embriões quatro dias pós-semeadura. **A.** Sadio; **B.** PRSV-P; **C.** PMeV.



#### 4.4. Avaliação da germinação e desenvolvimento das plântulas

Todos os resultados neste item, quando submetidos a testes estatísticos apresentaram os seguintes resultados: normal e significativo ao nível de 5% de probabilidade.

##### 4.4.1. Avaliação da biomassa de sementes

A pesagem dos lotes de sementes a serem germinadas foi realizada, obtendo-se uma diferença significativa apenas para o tratamento PMeV. Os tratamentos S e PRSV-P não se distinguiram estatisticamente (**Tabela 2**). Sugere-se então, que a presença do vírus PMeV prejudica a formação do fruto e, conseqüentemente, das sementes, em conformidade com os dados de Tapia-Tussell et al. (2014) que observou a formação deficiente do fruto em plantas infectadas com o vírus PMeV. Ademais, o referido autor também verificou que 83% das amostras utilizadas em seu experimento apresentavam resultado positivo na amplificação do vírus PMeV na região da testa da semente e 50% apresentaram resultado positivo na região do endosperma/embrião. Segundo Johansen (1994), os vírus podem invadir a região embrionária no período de formação e, assim, sobrevivem durante todo o período de maturação, armazenamento e germinação das sementes. A presença do vírus na região endosperma/ embrião pode justificar o valor inferior da pesagem das sementes do tratamento PMeV e, também, os valores detectados na curva de germinação (**Gráfico 1**), tendo em vista que a formação e a conseqüente germinação possivelmente ficaram prejudicadas em função da capacidade de manutenção do vírus.

A literatura relata que a perda na qualidade fisiológica das sementes não está restrita somente à transmissão do vírus por esta via. Kazinczi et al. (2006), em estudo realizado com dois tipos de vírus (*Pepino mosaic virus* e *Obuda pepper virus*), não transmitidos pela semente, observou que houve grande redução na taxa de germinação e produção de frutos. O referido autor também relata a incapacidade

das plantas germinadas absorverem normalmente os nutrientes necessários para o desenvolvimento do fruto e das sementes.

Por outro lado, estas alterações não foram observadas no tratamento PRSV-P, tendo em vista que a pesagem das sementes e a curva de germinação apresentaram valores bem próximos ao controle (Sadio). Com base nestes dados, reflete-se que a presença do vírus PRSV-P não prejudica a absorção de nutrientes e a formação das sementes. Sugere-se a existência de um deslocamento energético no período da maturação das sementes, tendo em vista que tanto a produtividade quanto o vigor dos mamoeiros infectados pelo vírus PRSV-P, segundo a literatura, são prejudicados pela infecção (TRIPATHI et al., 2008; RODRÍGUEZ et al. 2011).

Os valores do Índice de Velocidade da Germinação (IVG) e o Tempo médio de germinação (tm) foram significativamente maiores para as sementes do tratamento PMeV em relação ao controle (S), o que demonstra que estas sementes (PMeV) necessitaram de maior tempo para germinar e, por isso, apresentam menor vigor (SANTANA; RANAL, 2004). Para sementes do tratamento PRSV-P os valores do IVG e tm foram intermediários entre S e PMeV, o que revela a melhor germinabilidade e vigor em relação ao tratamento PMeV.

**Tabela 2:** Dados estatísticos relacionados à germinação

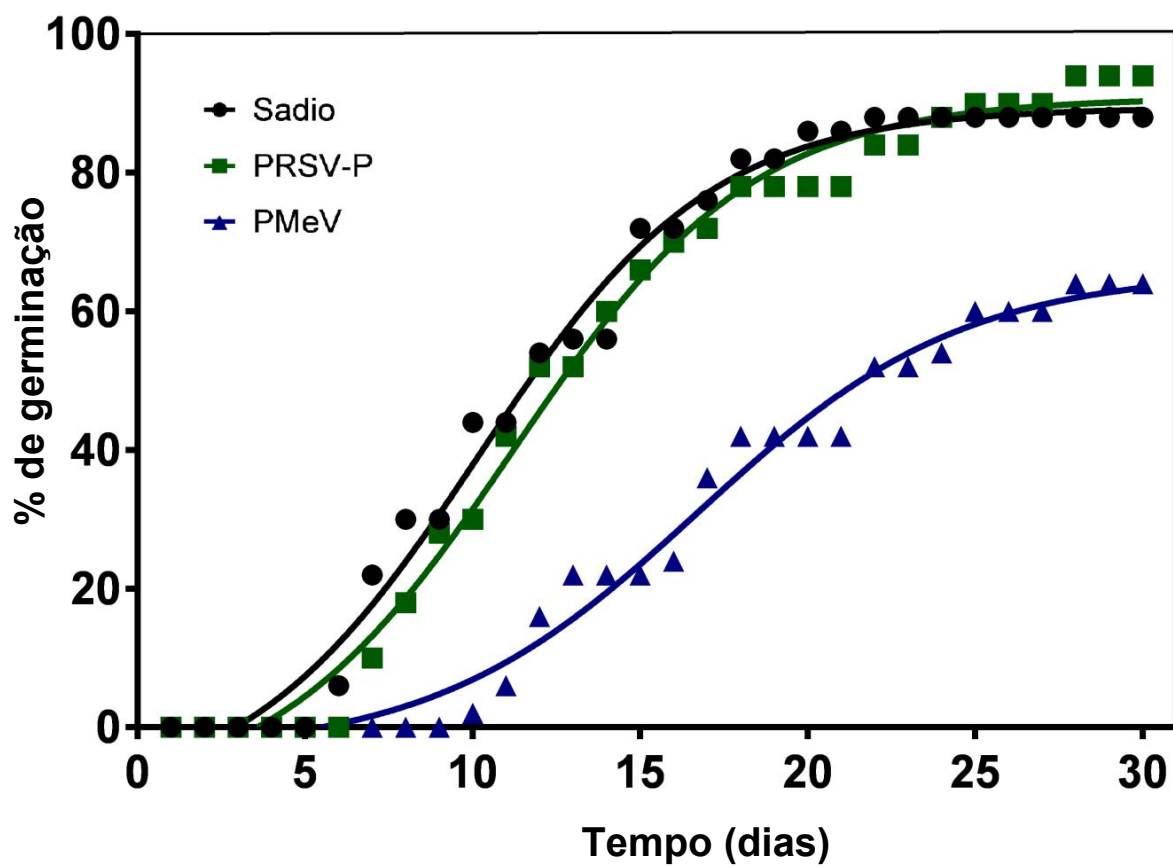
	<b>Sadio</b>	<b>PRSV-P</b>	<b>PMeV</b>	<b>P</b>
<b>Peso (gramas) (n= 50 sem.)</b>	0.96250	0.9350	0.7150 *	<0,01
<b>Porcentagem de germinação</b>	88	94	62 *	<0,01
<b>Índice de Velocidade de Germinação (IVG)</b>	12,2b	13,9ab	17,3a	<0,05
<b>Tempo médio de germinação (tm)</b>	11b	13ab	17a	<0,05

#### 4.4.2. Taxa de germinação

A curva de germinação (**Gráfico 1**) trata de uma representação da porcentagem da germinação acumulada em função do tempo. A partir da análise da mesma percebe-se que a porcentagem de germinação do tratamento PMeV (62%) foi significativamente inferior ao tratamento S (88%) – conforme a tabela 2 – corroborando com os resultados obtidos na microscopia de força atômica. Na literatura, dados semelhantes relacionados ao decréscimo da porcentagem de germinação em sementes de plantas de origem infectada foram relatados anteriormente (KAZINCZI et al., 2006; 2000). Inclusive, Tapia-Tussell et al. (2014), através de um teste de germinação, verificaram que o valor da porcentagem de germinação das sementes infectadas com o PMeV foi inferior (64%) à de plantas saudáveis (92%), corroborando com os resultados do presente trabalho.

Outro parâmetro importante, que pode ser observado na curva, é que o início do processo de germinação no tratamento PMeV apresentou um atraso em relação aos demais. Através deste dado, discute-se que a infecção viral, além de interferir significativamente na taxa de germinação, também aumenta o período dormência da semente – confirmado pelo cálculo de  $t_m$  (tempo médio de germinação). Tal fator também foi relatado por Kazinczi et al. (2006), que observou uma forte dormência nas sementes de plantas infectadas por vírus. Ademais, este retardo na germinação pode estar associado a ocorrência de um aumento na concentração do hormônio Ácido Absísico (ABA), como resposta ao estresse por infecção viral (FRASER AND WHENHAM, 1982), tendo em vista que tal hormônio está também diretamente relacionado à inibição da germinação em sementes.

No tocante aos dados obtidos no tratamento PRSV-P, a porcentagem total de germinação (94%) não distinguiu significativamente (**Tabela 2**) do tratamento controle (88%), sendo que o tratamento PRSV-P foi numericamente superior. Verifica-se então que a infecção do vírus PRSV-P não afetou a taxa de germinação indicando, possivelmente, que a presença deste não afeta o desenvolvimento e o vigor das sementes.



**Gráfico 1:** Porcentagem acumulada de germinação ao longo do tempo (dias).

#### 4.4.3. Análise do crescimento caulinar

O crescimento caulinar foi monitorado durante 30 dias, com medições feitas a cada 10 dias, totalizando 3 medições. Foram avaliados os dados de crescimento de 20 plantas (cinco plantas com quatro repetições) por tratamento. A partir de então, observou-se que o tratamento PMeV apresentou um crescimento significativamente inferior em relação às demais, exceto na primeira medição (**Tabela 3**), o que demonstra o baixo vigor das plântulas neste tratamento. Um dos motivos para este baixo crescimento pode estar associado também à baixa absorção de nutrientes importantes para o desenvolvimento da planta, como nitrogênio, fósforo e potássio, conforme relato da literatura (KAZINCZI et al., 2006). Além disto, a literatura também relata que em plantas infectadas por vírus ocorrem alterações nas concentrações hormonais: redução de Auxina e GA, hormônios importantes para promover o crescimento vegetal e aumento nas concentrações de ABA, hormônio que inibe o crescimento como resposta ao estresse (FRASER; WHENHAM, 1982). Tais fatores combinados ao baixo vigor das sementes podem ser responsáveis pelo baixo crescimento caulinar observado no tratamento PMeV.

	Sadio	PRSV-P	PMeV	P
<b>Dia 10</b>	3,6	4,5*	3,0	<0,01
<b>Dia 20</b>	4,8	5,4	4,2*	<0,01
<b>Dia 30</b>	6,5	6,4	4,9*	<0,01

**Tabela 3:** Valores médios do crescimento caulinar nas três medições realizadas.

Quanto ao tratamento PRSV-P, este, novamente, não apresentou alterações significativas em relação ao controle, exceto na primeira medição, em que obteve crescimento significativamente superior. Demonstrando que a infecção do vírus PRSV-P também não acarretou reflexos negativos sobre o crescimento das plantas. Aparentemente, o referido vírus não desencadeou alterações na concentração hormonal e absorção de nutrientes das plantas, como relatado anteriormente para o tratamento PMeV (FRASER; WHENHAM, 1982).

#### 4.4.4. Sobrevivência

A contabilização das plantas que sobreviveram foi realizada a cada 10 dias, a partir das 50 plantas transplantadas para cada tratamento. Baseando-se nos dados coletados é possível afirmar que, para o tratamento PMeV, apenas 25 plantas sobreviveram (50%). Por sua vez, estes números foram superiores para os demais tratamentos, sendo que no tratamento PRSV-P, 33 plantas (66%) e no tratamento controle (S), 36 plantas (72%) sobreviveram (**Gráfico 2**). Percebe-se, então, que os tratamentos PRSV-P e PMeV apresentaram um índice de sobrevivência inferior ao controle. A maioria das mortes ocorreu na primeira medição, antes mesmo da emergência das plântulas sobre o substrato, evidenciando o baixo vigor das mesmas, principalmente no tratamento PMeV que apresentou uma alta taxa de mortalidade (50%).

A literatura relata que a concentração de outro hormônio, o etileno, é aumentada durante a infecção viral. Este hormônio é responsável pelo aumento da senescência e das reações de necrose, nanismo e clorose dos tecidos (FRASER; WHENHAM, 1982, ALAZEM; LIN, 2014). O referido aumento na concentração deste hormônio pode representar a possível causa para a morte das plantas de origem infectada, principalmente em PMeV, que apresentou a menor taxa de sobrevivência. Johansen et al. (1994), relatam que epidemiologias virais fazem com que as plântulas germinadas se tornem piores competidoras que as plantas saudáveis, porque os sintomas, em função da infecção, podem ser tão severos a ponto de limitar o desenvolvimento e comprometer a sua produtividade e/ou sobrevivência.

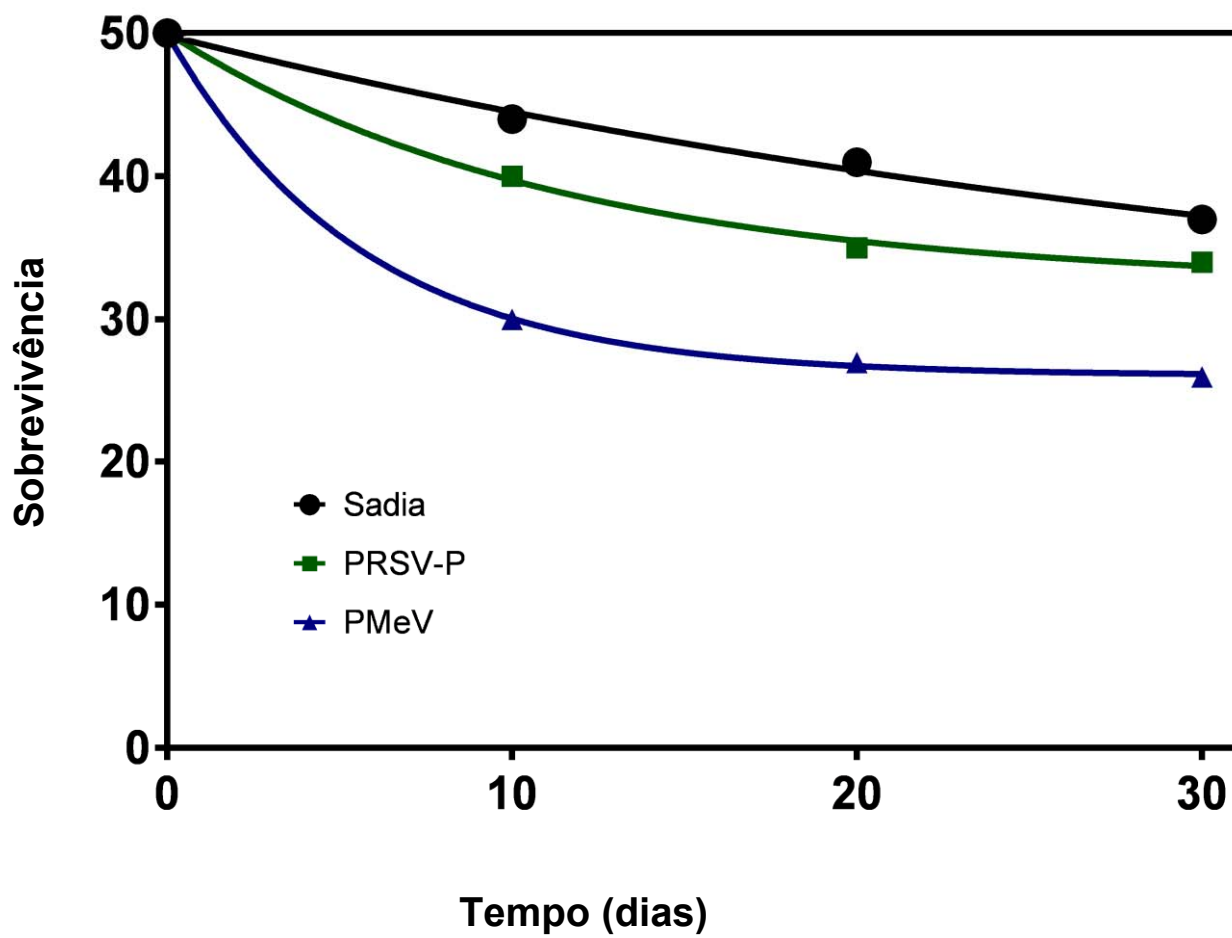
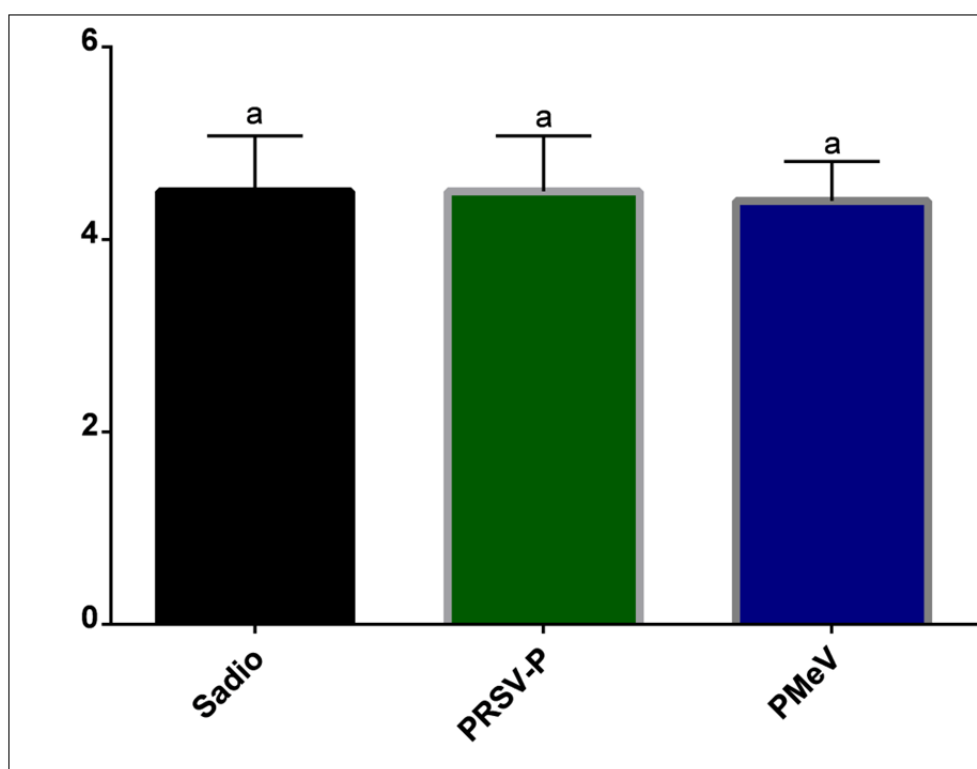


Gráfico 2: Número de plantas que sobreviveram ao longo dos 30 dias de medições.



#### 4.4.5. Avaliação do número de folhas

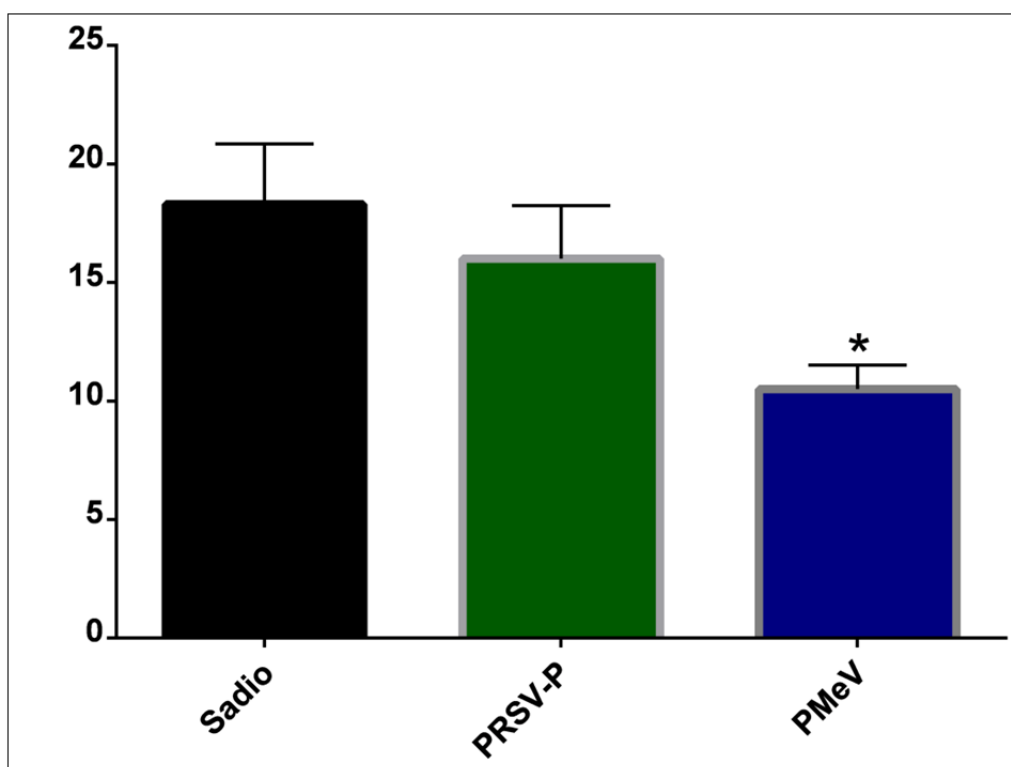
A avaliação do número de folhas foi realizada após a retirada das plantas do substrato (método destrutivo), ao final do experimento (30 dias). Observou-se que não houve diferença significativa entre os tratamentos (**Gráfico 3**). A média para todos os tratamentos foi em torno de 5 folhas por planta. Discute-se que, possivelmente, a diferenciação programada dos meristemas apicais não foi afetada pela infecção viral.



**Gráfico 3:** Número de folhas após 30 dias.

#### 4.4.6. Avaliação do comprimento das raízes

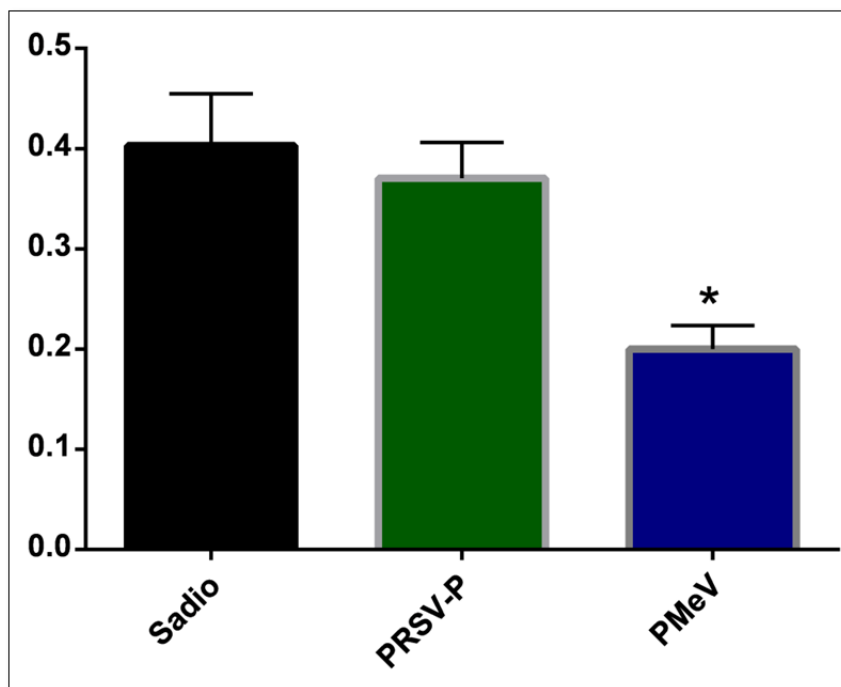
O comprimento das raízes (primárias e secundárias) foi aferido ao final do experimento. Observou-se que apenas o comprimento das raízes para o tratamento PMeV apresentou diferença significativa (**Gráfico 4**). Isto demonstra que, assim como no desenvolvimento caulinar, o desenvolvimento radicular também é inferior dentro deste tratamento (PMeV). A redução no comprimento da raiz em plantas de origem infectada, principalmente no período de desenvolvimento inicial, foi observada em mudas de batata infectadas por um complexo de vírus (VILLORDON; CLARK, 2014). Discute-se que a redução na absorção de nutrientes importantes para o desenvolvimento (KAZINCZI et al., 2006) pode estar associada à má formação das raízes observada nos dados, tendo em vista que as raízes são a via mais importante para tal absorção. Ademais, estes fatores poderão refletir diretamente no desenvolvimento destas plantas e na sua produção.



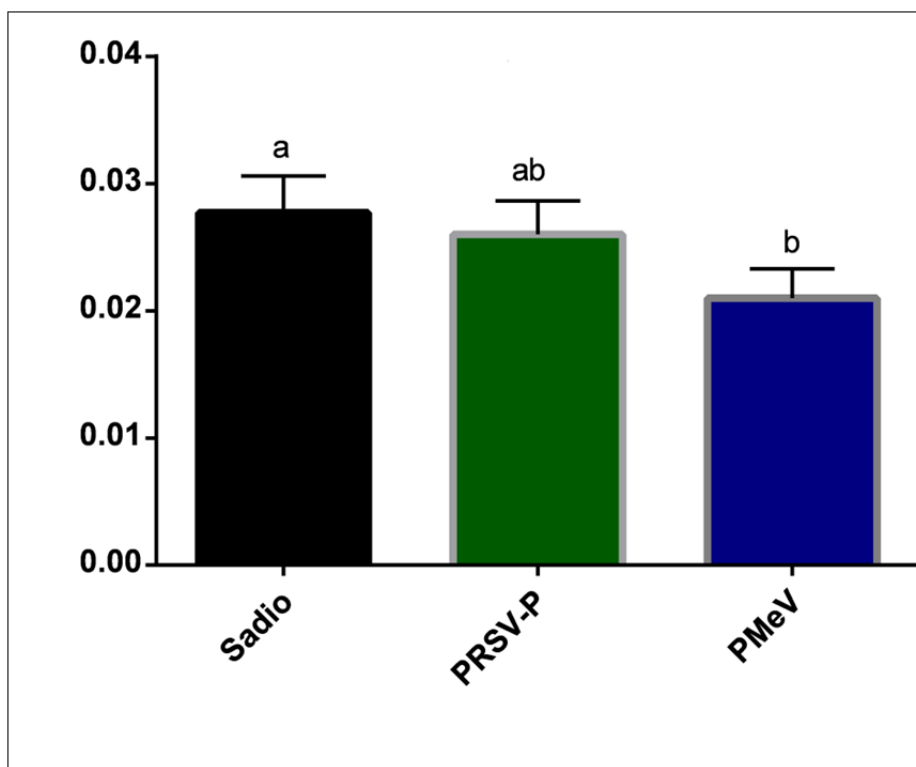
**Gráfico 4:** Comprimento de raiz (centímetros) após 30 dias.

#### 4.4.7. Biomassa

De acordo com os gráficos 6 e 7, verificou-se que a produção de biomassa nas plantas do tratamento PMeV foi significativamente reduzida, corroborando com os resultados que revelaram o baixo crescimento apical e radicular – conforme visto nos tópicos 4.4.3 e 4.4.6. A massa fresca, ou peso fresco, do tratamento PMeV apresentou uma redução de aproximadamente 50% em relação ao tratamento controle; o tratamento PRSV-P, por sua vez, não distinguiu significativamente do controle (**Gráfico 5**). Com relação à massa seca, o tratamento PRSV-P não se diferenciou dos demais tratamentos (Sadio e PMeV). A redução de biomassa em plantas de origem infectada foi relatada por Kazinczi et al. (2006), que verificou uma redução acentuada da massa seca e massa fresca em função da infecção viral.



**Gráfico 5:** Massa fresca (gramas) após 30 dias.



**Gráfico 6:** Massa seca (gramas) após 30 dias.

## 5. CONCLUSÕES

De maneira geral, houve um declínio para maioria dos dados analisados a partir das sementes do tratamento PMeV. Nos embriões analisados por microscopia de força atômica, verificou-se que todas as análises (0, 2, e 4 dias pós-semeadura), para o tratamento PMeV, apresentaram menor força de adesão em relação aos demais grupos, denotando que os embriões podem ter sofrido possíveis danos estruturais associados à má formação dos frutos e à infecção viral presente nos tecidos do endosperma-embrião. No que se refere às sementes do tratamento PMeV, o peso e porcentagem de germinação foram inferiores, já o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) foi significativamente superior. Este conjunto de dados revela o menor vigor destas sementes em relação ao controle. Além disso, verificou-se também um retardo na germinação para este tratamento, visualizado através do diagrama de força (AFM) no tempo de análise 04 dias pós-semeadura e, também evidenciado pelo cálculo do  $t_m$  (tempo médio de germinação). Adicionalmente, a redução na taxa germinativa e ao baixo vigor das sementes, o crescimento (caulinar e radicular), a taxa de sobrevivência e a biomassa das plântulas deste tratamento também foram significativamente reduzidas, o que demonstra que estas sementes originam plântulas de baixa qualidade (vigor).

Com relação ao tratamento PRSV-P, praticamente todos os dados não diferiram significativamente do controle (S), inclusive a pesagem das sementes, a taxa de germinação e o Índice de Velocidade de Germinação (IVG). Sendo assim, reflete-se que, apesar dos sintomas severos que este vírus pode causar quando transmitido ao mamoeiro, à formação das sementes não foi afetada pela presença do vírus. Na interpretação do diagrama de força do último tempo de análise (04 dias pós-semeadura), para o tratamento PRSV-P, percebeu-se que os valores de força de adesão foram superiores ao controle, o que pode ser explicado por um pequeno retardo de dois dias verificado através do cálculo de tempo médio de germinação – teste de germinação. A força de adesão para os embriões de PRSV-P no tempo de análise 0 dias, apresentou valores bem próximos aos do controle, revelando que os embriões deste tratamento, aparentemente, não apresentam alteração estruturais. Finalmente, quanto ao crescimento e a biomassa, estes dados não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle.



**Figura 17:** Etapas da germinação de sementes de *C. papaya*. 1. Semente seca (em dormência); 2. Testa turgida; 3. Início da quebra da dormência pelo rompimento da testa; 4, 5, e 6. Protusão e crescimento da radícula; 7. Desenvolvimento das raízes primárias e secundárias; 8. Aumento do comprimento das raízes, expansão do hipocótilo; 9. Início da formação das folhas primárias.

Com base no exposto, constata-se que:

- O vírus PMeV afeta consideravelmente a formação das sementes e, conseqüentemente, o desenvolvimento vegetativo, além de comprometer a estrutura dos tecidos embrionários das sementes;
- O vírus PRSV-P não afeta negativamente a formação das sementes e o desenvolvimento, sendo que praticamente todas as análises não se distinguiram significativamente do controle.
- Este comprometimento sobre as sementes em PMeV pode estar associado ao mecanismo de transmissão deste vírus via semente, e/ou a formação deficiente do fruto ocasionado por fatores ainda não conhecidos;
- Apesar das injúrias fisiológicas sobre as plantas infectadas por PRSV-P, a ausência de danos às sementes produzidas pode estar associada a um possível deslocamento energético que favorece a formação das sementes, tendo em vista que a qualidade do fruto também é comprometida em plantas doentes.

Assim sendo, a realização do presente trabalho foi relevante para melhor compreensão acerca da possível interferência dos referidos vírus na formação de novas plantas a partir de sementes de plantas infectadas. Através das constatações realizadas, afirma-se que a utilização das sementes de plantas infectadas com

PRSV-P, possivelmente, não acarreta interferência. Mesmo que a legislação não permita o crescimento de plantas infectadas até a formação do fruto, é interessante averiguar que a presença deste vírus não acarreta declínio biológico significativo para a progênie (sementes). Além disso, foi importante também a verificação de que o vírus PMeV desencadeia um declínio da qualidade fisiológica nas sementes de forma muito significativa. Ademais, neste trabalho foi realizada a análise de embriões de *C. papaya* por meio da técnica microscopia de força atômica (AFM), aplicação esta até então não reportado na literatura. Tendo em vista o grande potencial da referida técnica para estudos biológicos, especialmente em plantas, tornou-se relevante sua implementação nesta análise, sendo que a mesma viabilizou a observação da força de adesão em diferentes estágios de desenvolvimento das sementes.

Finalmente, a partir do exposto, constatou-se a necessidade da investigação dos mecanismos de atuação do PMeV sobre a formação da semente; o modo de entrada do vírus na região embrionária e a atuação da infecção viral na redução da biomassa da semente e no enfraquecimento estrutural da parede celular embrionária. Propõe-se também a averiguação acerca do mecanismo de formação de sementes de plantas infectadas com PRSV-P que não propicia o surgimento danos fisiológicos, tendo em vista que este ao mesmo tempo desencadeia sintomas severos sobre a planta.

## 6. REFERÊNCIAS

- ABREU, Paolla Mendes do Vale. **Indução de resistência ao *Papaya meleira virus* em mamoeiros**. 2011. 92p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2011.
- ABREU, P. M. V.; PICCIN, J. G.; RODRIGUES, S. P.; BUSS, D. S.; VENTURA, J. A.; FERNANDES, P. M. B. Molecular diagnosis of *Papaya meleira virus* (PMeV) from leaf samples of *Carica papaya* L. using conventional and real-time RT-PCR. **Journal of Virological Methods**, v.180, p.11-17, 2012.
- ALAZEM, M; LIN N. Roles of plant hormones in the regulation of host–virus interactions. **Molecular Plant Pathology**. p.1-12, 2014.
- ALAZEM, M; LIN; K.; LIN, N. The Absciscic Acid pathway has multifaceted effects on the accumulation of *Bamboo mosaic virus*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.27, n.2, p.177–189, 2014.
- ALTHOFF, M. A.; CARMONA, R. Conservação de sementes de mamão (*Carica papaya* - Caricaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v.21, n.1, p.151-156, 1999.
- ANDRADE-MAHECHA, M. M.; MORALES-RODRÍGUEZ, O. Y.; MARTÍNEZ-CORREA, H. A. Estudo do processo de extração de papaína a partir do látex do fruto de mamão (*Carica papaya* L.) cv. Maradol. **Acta Agronómica**. 2011.
- ARAUJO, M. M.; TAVARES, E. T.; SILVA, F. R.; MARINHO, V. L.; JUNIOR, M. T. Molecular detection of *Papaya meleira virus* in the latex of *Carica papaya* by RT-PCR. **Journal Virology Methods**, v.146, p.305–310, 2007.
- ASSISTAT: Assistência estatística. Versão 7.7 beta: DEAG-CTRN-UFCG, Campina Grande, 2014.
- BRAPEX - Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Papaya. **Exportações de mamão**. Disponível em: <<http://www.brapex.net>>. Acesso em: 10dez.2014.
- BARKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination**. 2 ed. Elsevier, 2014. 327 p.



BINNIG, G.; QUATE, C. F. Atomic Force Microscope. **Physical Review Letters**, v.56, n. 9, p. 930-934, 1986.

CARDOSO, Deisy Lúcia. **Análise dialélica para rendimento e qualidade de frutos de mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. 2012. 96p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2012.

CARRILLO-CASTAÑEDA, G. M.; BAUTISTA-CALLES, F.; VILLEGAS-MONTER, A. Postharvest seed treatments to improve the papaya seed germination and seedlings development. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v.16, p.133 -141, 2013.

CHOW, Y.J.; LIN, C.H. Para-hydroxybenzoic acid as the major phenolic germination inhibitor of papaya seed. **Seed Science and Technology**, v.19, p.167-174, 1991.

DALTRO, C. B.; ABREU, E. F. M.; ARAGÃO, F. J. L.; ANDRADE, E. C. Genetic diversity studies of *Papaya meleira virus* . **Tropical Plant Pathology**, v.39, n.1, p.104-108,2014.

DEPUYDT, S; HARDTKE, C. S. Hormone Signalling Crosstalk in Plant Growth Regulation. **Current Biology**, v.21, p.365-373, 2011.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem. Bull.** v.19, p.11-15, 1987.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Brasil). **Mamão: Fitossanidade**. Brasília, 2000, 91p.

FERREIRA, A. A. P.; YAMANAKA, H. Microscopia de Força Atômica aplicada em imunoensaios. **Química Nova**, v.29, n.1, p.137-142, 2006.

FOGAÇA, C. A.; MALAVASI, M. M.; ZUCARELI, C.; MALAVASI, U. C. Aplicação do teste de tetrazólio em sementes de *Gleditschia amorphoides* taub. *Caesalpinaceae*. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.3, p.101-107, 2006.

FRASER, R. S. S.; WHENHAM. Plant growth regulators and viral infection. **Plant Growth Regulation**, v.1, p.37-59, 1982.

GASPAR-OLIVEIRA, C. M.; MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Semente**, v.32, n.1, p.186-196, 2010.

GAUR, T. H.; SHARMA, P. **Plant Virus-Host Interaction: Molecular Approaches and Viral Evolution**. Elsevier, p. 105, 2013. 430 p.

GEN BANK. **Papaya ringspot virus isolate ES biotype P coat protein (cp) gene, partial cds**, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF344644>>. Acesso em: 20 set. 2013.

GOLDBERG, R. B.; PAIVA, G.; YADEGARI, R. Plant Embryogenesis: Zygote to Seed. **Science**, v. 266, p. 605-614, 1994.

GRAPHPAD PRISM. Version 6.0 Demo. 2014.

HEMMATI, K.; MC LEAN, D. L. Gamete-Seed Transmission of *Alfalfa Mosaic Virus* and Its Effect on Seed Germination and Yield in Alfalfa Plants. **Disease Detection and Losses**, 1977.

HERRMANN, P. S. P.; SILVA, M. A. P.; BERNARDES, R.; JOB, A. E.; COLNAGO, L. A.; FROMMER, J. E.; MATTOSO, L. H. C. Microscopia de Varredura por Força: uma Ferramenta Poderosa no Estudo de Polímeros. **Polímeros**, v.7, n.4, p.51-61, 1997.

HONG, T.D.; ELLIS, R.H. **A protocol to determine seed storage behaviour**. Reading: International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Technical Bulletin, v. 1, 1996. 62p.

HULL, R. **Plant Virology**. 5ed. Academic Press, p.545-563, 2013, 981p.

HUNTER, D. G.; BOWYER, J. W. Cytopathology of lettuce mosaic virus-infected lettuce seeds and seedlings. **Journal of Phytopathology**, v.37, p.61-72, 1993.

IBRAF - Instituto Brasileiro de Frutas (Brasil). **Panorama da cadeia produtiva das frutas 2012**. Brasília, 2012, 133p.

INCAPER- Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Espírito Santo). **Desenvolvimento da Fruticultura**: Disponível em: <<http://incaper.web407.uni5.net/revista.php?idcap=978>>. Acesso em: 02 jan. 2015.

INCAPER- Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (Espírito Santo). **Fruticultura:** Disponível em: <<http://www.incaper.es.gov.br/pedeag/setores06.htm>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

IRWIN, M. E.; GOODMAN, R. M. Ecology and control of soybean mosaic virus. **Plant Protect**, v.76, p. 181-229, 1981.

JOHANSEN, E.; EDWARDS, M. C.; HAMPTON, R. O. Seed transmission of viruses: current perspectives. **Annual Review Phytopathology**, v.32, p.363-386, 1994.

KASAS, S.; THOMSON, N. H.; SMITH, B. L.; HANSMA, H. G.; ZHU, X; GUTHOLD, M; BUSTAMANTE, C.; KOOL, E. T.; KASHLEV, M.; HANSMA, P. K. Escherichia coli RNA polymerase activity observed using atomic force microscopy. **Biochemistry**, v.36, n.3, p. 461-468, 1997.

KAZINCZI, G.; HORVÁTH, J.; LUKÁCS, D. Germination characteristics of Chenopodium seeds derived from healthy and virus infected plants. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**, v.17, p.63-67, 2000.

KAZINCZI, G.; PRIBÉK, D.; TAKÁCS, A. Biological decline of *Solanum nigrum* L. due to tobacco mosaic *tobamovirus* (TMV) infection. I. Growth and nutrient uptake. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, v.36, p.9-14, 2001.

KAZINCZI, G.; HORVÁTH, J.; TAKÁCS, A.; PRIBÉK, D. Biological decline of *Solanum nigrum* L. due to Tobacco mosaic *tobamovirus* (TMV) infection. II. Germination, seed transmission, seed viability and seed production. **Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica**, v.37, p.329-333, 2002a.

KAZINCZI, G.; LUKÁCS, D.; TAKÁCS, A.; HORVÁTH, J.; GÁBORJÁNYI, R.; NÁDASY, M.; NÁDASY, E. Biological decline of *Solanum nigrum* due to virus infections. **Journal of Plant Diseases and Protection**, p.325-330, 2006,

KÖPPEN, W.; GEIGER, R. **Klimate der Erde**. Gotha: Verlag Justus Perthes. Wall-map, 1928.

KUZNETSOV, Y.G.; VICTORIA, J. G.; ROBINSON JR, W. E.; MCPHERSON, A. Atomic force microscopy investigation of human immunodeficiency virus (HIV) and HIV-infected lymphocytes. **Journal of Virology**, v.77, n.22, p.11896-11909, 2003.

KUZNETSOV, Y. G.; LOW, A.; FAN, H.; MC PHERSON, A. Atomic force microscopy investigation of wild-type *Moloney murine leukemia virus* particles and virus particles lacking the envelope protein. **Virology**, v.323, p.189-196, 2004.

KUZNETSOV, Y. G.; MC PHERSON, A. Atomic Force Microscopy in Imaging of Viruses and Virus-Infected Cells. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.75, n.2, p.268-285, 2011.

LABAVICH, J. M. Cell wall turnover in plant development. **Annual Review Plant Physiology**, v.32, p.385-406, 1981.

LIMA, R. C. A.; LIMA, J. A. A.; SOUZA JR, M. T.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G. P. Etiologia e estratégias de controle de viroses do mamoeiro no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.4, p.689-702, 2001.

LIU, W.; CHANG, Y.; CHEN, S. C.; LU, C.; WU, Y.; LU, M. J.; CHEN, D.; SHIH, A. C.; SHEUE, C.; HUANG, H.; YU, C.; LIN, H.; SHIU, S.; KU, M. S.; LI, W. Anatomical and transcriptional dynamics of maize embryonic leaves during seed germination. **PNAS**, v.110, n.10, p.3979-3984, 2013.

MAGUIRE, J.D. Speeds of germination-aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v.2, p.176- 177, 1962.

MANICA, I.; MARTINS, D. S.; VENTURA, J. A. **Mamão: Tecnologia de produção pós colheita, exportação, mercados**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2006. 361p.

MANSILLA, P. J.; MOREIRA, A. G.; MELLO, A. P. O. A.; REZENDE, J. A. M.; VENTURA, J. A.; YUKI, V. A.; LEVATTI, F. J. Importance of cucurbits in the epidemiology of *Papaya ringspot virus* type P. **Plant Pathology**, v.62, p.571-577, 2013.

MCALLISTER, C.; KARYMOV, M. A.; KAWANO, Y.; LUSHNIKOV, A. Y.; MIKHEIKIN, A.; UVERSKY, V. N. Protein interactions and misfolding analyzed by AFM force spectroscopy. **Journal Molecular Biology**, v.354, p.1028-1042, 2005.

MCDONALD, M. B.. **Physiology of Seed Germination**. Disponível em: <[http://seedbiology.osu.edu/HCS631\\_files/Seedgermination.pdf](http://seedbiology.osu.edu/HCS631_files/Seedgermination.pdf)>. Acesso em: 10jan.2015.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil). **Regras para a análise de sementes**. Brasília, 2009, 398p.

PAZ, L.; VÁZQUEZ-YANES, C. Comparative seed ecophysiology of wild and cultivated *Carica papaya* trees from a tropical rain forest region in Mexico. **Tree Physiology**, v.18, p. 277-280, 1998.

PEREZ-BRITO, D.; TAPIA-TUSSELL, R.; CORTES-VELAZQUEZ, A.; QUIJANO-RAMAYO, A.; NEXTICAPAN-GARCEZ, A.; MARTÍN-MEXPEREZ, R. First report of Papaya meleira virus (PMeV) in México. **African Journal of Biotechnology**, v.11, n.71, p.13564-13570, 2012

POLYAKOV, P.; SOUSSEN, C.; DUAN, J.; DUVAL, J. F. L.; BRIE, D.; FRANCIUS, G. Automated Force Volume Image Processing for Biological Samples. **Plos One**, v.6, p.1-20, 2011.

PRIMER 3 PLUS. Versão 0.4, 2013. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>>. Acesso em: 01 out. 2013.

RAVEN, P. H.; EICHHORN, S. E.; EVERT, R. F. **Biologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. 876p.

RENNER, G. D. R.; CAMACHO, F.; PEIXE, S. Ação da temperatura, ácido giberélico e luz na germinação de sementes de fáfia – *Pfaffia glomerata* (Spreng.). **Semina: Ciências Agrárias**: Londrina, v. 28, n. 3, p. 349-354, 2007.

RIPPE, K.; GUTHOLD, M.; VON HIPPEL, P. H.; BUSTAMANTE, C. Transcriptional activation via DNA-looping: visualization of intermediates in the activation pathway of *E. coli* RNA polymerases 54 holoenzyme by scanning force microscopy. **Journal of Molecular Biology**, v.270, n.2, p.125-138, 1997.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v.1, p.499-514, 1973.

RODRIGUES, Silas Pessini. **Interação entre o Papaya meleira virus (PMeV) e o Mamoeiro (*Carica papaya* L.)**. 2006. 107p. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal)- Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2006.

RODRIGUES, S. P.; ANDRADE, J. S.; VENTURA, J.A.; FERNANDES, P.M.B. Simplified molecular method for the diagnosis of *Papaya meleira* virus in papaya latex and tissues. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, 2005.

RODRÍGUEZ, D.; TORNET, Y.; ALONSO, M.; VALERO, L.; FIGUEIRA, I. P. A.; RAMOS, R. Severidade da mancha anelar do mamoeiro em diferentes genótipos do tratamento solo introduzidos em Cuba. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 2, n.4, p. 28-36, 2011.

RUGGIERO, C.; MARIN, S. L. D.; DURIGAN, J. F. Mamão, uma história de sucesso. **Revista Brasileira de Fruticultura**: Jaboticabal, v.especial, p.76-82, 2011.

SALOMÃO, A. N.; MUNDIM, R.C. Germination of Papaya Seed in Response to Desiccation, Exposure to Subzero Temperatures, and Gibberellic Acid. **Hortscience**, v.35, n.5, p.904–906, 2000.

SANTANA, D. G.; RANAL, M. A. **Análise da germinação**. Brasília: UNB, p.99-206, 2004. 246p.

SOUZA, C. R.; OHLSON, O. C; GAVAZZA, M. I. A.; PANOBIANCO, M. Tetrazolium test for evaluating tritcale seed viability. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.3 p.163-169, 2010.

TAIZ, L; ZEIGER, Z. **Fisiologia Vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 456-483, 2013. 918 p.

TAPIA-TUSSELL, R.; MAGAÑA-ALVAREZ, A.; CORTES-VELAZQUEZ, A.; ITZAKUK, G.; NEXTICAPAN-GARCEZ, A.; QUIJANO-RAMAYO, A.; MARTIN-MEX, R.; PEREZ-BRITO, D. Seed transmission of Papaya meleira virus in papaya (*Carica papaya*) cv. Maradol. **Plant Pathology**, p.1-4 2014.

TOKUHISA, D.; DIAS, D. C. F. S.; ALVARENGA, E. M.; DIAS, L. A. S; MARIN, S. L. D. Tratamentos para superação da dormência em sementes de mamão. **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n.1, p.131-139, 2007.

TRIPATHI, S.; SUZUKI, J. Y.; FERREIRA, S. A.; GONSALVES, D. *Papaya ringspot virus-P*: characteristics, pathogenicity, sequence, variability and control. **Molecular Plant Pathology**, v.9, n.3, p. 269-280, 2008.

VERBELEN, C.; DUFRÊNE, Y. F. Direct measurement of Mycobacterium–fibronectin interactions. **Integrative Biology**, v.1, p.296–300, 2009.

VILLORDON, A. Q.; CLARK, C. A. Variation in virus symptom development and root architecture attributes at the onset of storage root initiation in 'Beauregard' Sweetpotato plants grown with or without nitrogen. **Plos One**, v.9, n.9, p.1-7, 2014.

WADA, S.; TANIMOTO, E.; MASUDA, Y. Cell elongation and metabolic turnover of the cell wall as affected. **Annual Review Plant Physiology**, v.32, 1968.

WEBB, H. K.; TRUONG, V. K.; HASAN, J.; CRAWFORD, R. J.; IVANOVA, E. P. Physico-mechanical characterization of cells using atomic force microscopy: Current research and methodologies. **Journal of Microbiological Methods**. v.86, p. 131–139, 2011.

WOODENBERG, W. R.; PAMMENTER, N. W.; FARRANT, J. M.; DRIOUICH, A. BERJAK, P. Embryo cell wall properties in relation to development and desiccation in the recalcitrant-seeded *Encephalartos natalensis* (Zamiaceae) Dyer and Verdoorn. **Protoplasma**, v.252, p.245-258, 2015.

YEH, S.D.; JAN, F.J.; CHIANG, C.H.; DOONG, T.J.; CHEN, M.C.; CHUNG, P.H.; BAU, H.J. Complete nucleotide sequence and genetic organization of papaya ringspot virus RNA. **Journal of General Virology**, v.73, p.2531-2541, 1992.

ZAMBOLIM, E. M.; ALONSO, S. K.; MATSUOKA, K. M.; CARVALHO, M. G.; ZERBINI, F. M.; Purification and some properties of *Papaya meleira virus*, a novel virus infecting papayas in Brazil. **Plant Pathology**, v.52, p.389–394, 2003.

## **ANEXO 1- PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS**

1. As amostras (folhas) devem ser pulverizadas (trituradas) em nitrogênio líquido;
2. Transferir 100mg do material triturado (amostra) para um microtubo de 1.5 ml contendo 10 mg de Polivinilpirrolidona (PVP) e 10 mg de pérola de vidro;
3. Adicionar 1 ml de tampão de extração CTAB 2%, segundo Doyle e Doyle (1987);
4. Adicionar 10  $\mu$ l de  $\beta$ -Mercaptoetanol em cada uma das amostras;
6. Agitar (2x10');;
7. Centrifugar por 15 minutos a 13000 rpm à 4°C ;
8. Coletar o sobrenadante em um microtubo de 2,0 ml e descartar o precipitado;
9. Adicionar 1ml da solução fenol-clorofórmio-álcool isoamílico ( Proporção 24:12:1);
10. Agitar e centrifugar por 15 minutos a 13000 rpm à 4°C;
11. Coletar cuidadosamente o sobrenadante;
12. Repetir os passos 9. e 10;
13. Coletar novamente o sobrenadante e adicionar 1ml de clorofórmio-álcool isoamílico (proporção 24:1);
14. Agitar e centrifugar por 15 minutos a 13000 rpm à 4°C;
15. Coletar o sobrenadante em um microtubo de 1,5 ml, adicionar 600  $\mu$ l de etanol absoluto previamente gelado e 60  $\mu$ l de Acetato de sódio gelado (3M pH 5.2);
16. Agitar e incubar a -80 por 30 minutos;
17. Centrifugar a 13000 rpm à 4°C por 1 hora;
18. Descartar o sobrenadante;
19. Lavar o “pellet” com 300  $\mu$ l de etanol 75% gelado;
20. Agitar e centrifugar a 13000 rpm à 4°C por 15 minutos;
21. Descartar o sobrenadante por inversão, e colocar os tubos de 1.5 em papel (toalha) durante 30 minutos para secagem;
22. Ressuspender o “pellet” em 40  $\mu$ l de água livre de RNAses;



**23.** Agitar com a pipeta até solubilizar o “pellet”;

**24.** Estocar à -20°C.